

ARIANI CORRÊA BARBOSA

***Colletotrichum acutatum*: MELANIZAÇÃO, PENETRAÇÃO EM MEMBRANAS
ARTIFICIAIS, AUTOFAGIA E MOBILIZAÇÃO DE LIPÍDEOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ruth Janice Guse
Schadeck

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Lucélia Donatti

CURITIBA

2007

À meus pais que me deram a vida e todo o
conhecimento mais precioso que adquiri

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho dedico meus sinceros agradecimentos.

Em especial a minha orientadora Ruth J. G. Schadeck, pelo bom humor e alto astral com que sempre realizava os experimentos, pela extensa leitura dessa dissertação, e pela ajuda e comprometimento constantes com a minha formação, sentirei saudades e serei eternamente grata.

À minha co-orientadora Lucélia Donatti, pela ajuda sempre presente e ao longo do desenvolvimento das pesquisas, especialmente no preparo e análise do material de microscopia eletrônica.

Ao professor Marco Randi, pelo auxílio nas análises estatísticas e de imagem, e pelo esclarecimento de inúmeras dúvidas referentes à realização deste trabalho.

Ao Sr. Herculano Salviano dos Reis Filho e aos integrantes do seu laboratório, as senhoras Rosalina de Moraes e Eliane Regina do Nascimento Mendes, por todo o suporte técnico desde a minha graduação.

À professora Dorly de F. Buchi e os membros do seu laboratório, pela eterna prontidão em ajudar e por todo o auxílio com reagentes e técnicas.

Às secretárias Gerizalda J. Bernardo e Marlene B. de Camargo pelo constante apoio nos assuntos administrativos.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, Vera Regina, Rosângela, Sérgio e Matilde pela imensa ajuda na utilização dos microscópios e técnicas de microscopia eletrônica.

Aos professores Silvio Marques Zanata e Célia Regina Cavichiolo Franco por todo apoio enquanto coordenadores do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular no período do desenvolvimento dos trabalhos.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Marcelo pela ajuda nas análises de imagem de lipídeos.

Ao Sandro também pela ajuda nas análises de imagem dos lipídeos, por todo o suporte de informática e a leitura crítica de partes deste trabalho, e especialmente pela imensa contribuição para a finalização e impressão desta dissertação. Eu não teria terminado sem você.

Aos colegas do programa de pós-graduação Grazyele e Francisco pelo auxílio nos assuntos gerais durante o curso.

À minha família, meu pai Wilson, minha mãe Terezinha e minhas irmãs Wilciele e Samoara por todo o apoio e incentivo que sempre me deram, e à Samoara por ter cuidado de mim em momentos da escrita desta dissertação.

À Andréia, Geórgia e Jociene, eternas amigas e notáveis personagens na minha existência, pela feliz convivência e preciosos momentos que tivemos. Adoro vocês.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS.....	xi
LISTA DE FILMES.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA GERMINAÇÃO E INFECÇÃO.....	4
2.1.1 Germinação e Penetração da Planta Hospedeira.....	4
2.2 CORPOS LIPÍDICOS.....	5
2.2.1 Ultraestrutura dos Corpos Lipídicos.....	6
2.2.2 Mobilização de Lipídeos e Infecção.....	6
2.3 MELANINA E SUAS FUNÇÕES BIOLÓGICAS.....	7
2.3.1 Biossíntese e Localização.....	7
2.3.2 Estudos de Melanização por Microscopia.....	9
2.3.3 Funções da Melanina.....	10
2.3.4 Melanização e Infecção.....	11
2.3.5 Penetração sem melanização.....	13
2.4 O PAPEL DAS ENZIMAS NA PENETRAÇÃO.....	14
2.5 MATRIZ EXTRACELULAR EM FUNGOS PATÓGENOS.....	15
2.6 FORMAÇÃO DOS CONÍDIOS.....	16
2.6.1 Conidiação Macrocíclica.....	16
2.6.2 Conídios Secundários.....	17
2.6.3 Estudo da Conidiação Microcíclica e Macrocíclica.....	18
2.7 VACÚOLOS FÚNGICOS.....	18
2.8 AUTOFAGIA E ENVELHECIMENTO.....	20
2.8.1 Importância da Autofagia.....	20
2.8.2 Uso de Inibidores no Estudo da Autofagia.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23

4.1 CULTIVO E GERMINAÇÃO.....	23
4.1.1 Obtenção dos Conídios Germinados.....	23
4.2 INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE MELANINA E PENETRAÇÃO EM MEMBRANA DE CELOFANE.....	23
4.3 INDUÇÃO DA CONIDIOGÊNESE SOBRE LAMÍNULAS DE VIDRO.....	24
4.4 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA, CONFOCAL E DIC	25
4.5 COLORAÇÃO DE LIPÍDEOS COM VERMELHO NILO.....	25
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDEOS EM CONÍDIOS TRATADOS COM.....	25
CARPROPAMIDA E SACAROSE.....	25
4.7 IDENTIFICAÇÃO DE VESÍCULAS ÁCIDAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA CONFOCAL	26
4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE BAIXO VÁCUO DA CULTURA E DE CONÍDIOS GERMINADOS.....	26
4.9 MEV DE ALTO VÁCUO.....	27
4.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	27
4.10.1 Obtenção dos Conídios Germinados para MET.....	27
4.10.2 Processamento dos Conídios Germinado e de Fragmentos de Cultura.....	28
4.11 TRATAMENTO COM PMSF.....	28
4.12 PROCESSAMENTO DE IMAGEM.....	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DA GERMINAÇÃO NA PRESENÇA DO INIBIDOR DE SÍNTESE DE MELANINA.....	30
5.1.1 Penetração em Membranas de Celofane.....	30
5.1.2 Melanização e Bloqueio das Colorações Fluorescentes.....	32
5.1.3 Distribuição dos Corpos Lipídicos Durante a Germinação e Penetração.....	34
5.1.4 Padrões de Germinação na Presença de Carpropamida.....	37
5.1.5 Estudo Estatístico do Perfil de Germinação e Penetração na Presença do Inibidor de Síntese de Melanina.....	39
5.1.5.1 Porcentagem de germinação.....	39
5.1.5.2 Melanização e penetração.....	39
5.1.5.3 Tubos germinativos.....	40
5.1.5.4 Conídios secundários.....	40

5.1.5.5	Apressórios secundários.....	41
5.1.6	Quantificação de Lipídeos em Conídios Germinados Tratados com Carpropamida e Sacarose.....	44
5.1.7	Corpos Lipídicos dos Conídios não Germinados.....	45
5.1.8	Matriz Extracelular Durante a Germinação.....	46
5.1.9	Aspectos Ultraestruturais de Apressórios.....	51
5.1.9.1	MET células controle.....	51
5.1.9.2	MET de apressórios hialinos.....	54
5.1.9.3	Evidências de secreção celular.....	54
5.2	CONIDIOGÊNESE EM <i>C. acutatum</i>	56
5.2.1	Caracterização Ultraestrutural do Micélio e Conidiação Macrocíclica.....	56
5.2.2	Características Gerais da Germinação e Conidiação Microcíclica.....	61
5.2.2.1	MEV de conídios secundários.....	63
5.2.2.2	Corpos lipídicos	65
5.2.2.3	Vacúolos e internalização dos corpos lipídicos durante a conidiação microcíclica	65
5.3	DINÂMICA DOS VACÚOLOS E LIPÍDEOS DURANTE A GERMINAÇÃO E ENVELHECIMENTO	69
5.3.1	Mobilização de Lipídeos e Vacuolização.....	69
5.3.1.1	Internalização de lipídeos e autofagia.....	72
5.3.1.2	Inibição da digestão celular em conídios não germinados.....	73
6.	DISCUSSÃO.....	75
6.1	ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DA GERMINAÇÃO NA PRESENÇA DO INIBIDOR DE SÍNTESE DE MELANINA.....	75
6.1.1	Germinação e Penetração em Membranas de Celofane.....	75
6.1.2	Acúmulo de Corpos Lipídicos nos Conídios Tratados com Carpropamida e Sacarose.....	78
6.1.3	Matriz Extracelular.....	81
6.1.4	Estudos Ultraestruturais.....	82
6.2	CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE CONÍDIOS DE <i>C. acutatum</i>	84
6.2.1	Conidiogênese em Culturas.....	84

6.2.2	Germinação, Formação de Conídios Secundários e Mobilização de Lipídeos.....	85
6.2.3	Formação de Conídios Secundários, Tubos Germinativos e Apressórios Secundários na Presença de Carpropamida.....	87
6.3	DINÂMICA DOS VACÚOLOS E LIPÍDEOS DURANTE A GERMINAÇÃO E ENVELHECIMENTO.....	89
7.	CONCLUSÃO.....	92
8.	REFERÊNCIAS.....	93
	APÊNDICES.....	105

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - GERMINAÇÃO E FORMAÇÃO DE APRESSÓRIOS EM <i>C. acutatum</i>	4
FIGURA 2 - PENETRAÇÃO A PARTIR DE APRESSÓRIOS MELANIZADOS E NÃO MELANIZADOS.....	31
FIGURA 3 - PENETRAÇÃO A PARTIR DE APRESSÓRIO HIALINO DO CONTROLE.....	32
FIGURA 4 - COLORAÇÃO COM VERMELHO NILO E LARANJA DE ACRIDINA DE CONÍDIOS COM APRESSÓRIOS MELANIZADOS E NÃO MELANIZADOS.....	33
FIGURA 5 - CORPOS LIPÍDICOS E PENETRAÇÃO A PARTIR DE APRESSÓRIOS HIALINOS DO CONTROLE.....	35
FIGURA 6 - CORPOS LIPÍDICOS, INIBIÇÃO DA MELANIZAÇÃO E PENETRAÇÃO NA PRESENÇA DE CARPROPAMIDA.....	36
FIGURA 7 - PADRÕES DE GERMINAÇÃO NA PRESENÇA DE CARPROPAMIDA.....	38
FIGURA 8 - GERMINAÇÃO NA PRESENÇA DE 0,1% DE SACAROSE.....	44
FIGURA 9 - ULTRAESTRUTURA DE CONÍDIOS NÃO GERMINADOS NA INCUBAÇÃO COM CARPROPAMIDA.....	46
FIGURA 10 - MATRIZ EXTRACELULAR NO TRATAMENTO COM CARPROPAMIDA.....	48
FIGURA 11 - GRAUS DE DEPOSIÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR EM APRESSÓRIOS DO CONTROLE.....	49
FIGURA 12 - GRAUS DE DEPOSIÇÃO DE MATRIZ EXTRALELULAR EM APRESSÓRIOS DO TRATAMENTO COM CARPROPAMIDA.....	49
FIGURA 13 - MET DA MATRIZ EXTRACELULAR EM CÉLULAS DO CONTROLE.....	51
FIGURA 14 - PAREDE CELULAR DO APRESSÓRIO MELANIZADO.....	52
FIGURA 15 - MET DE APRESSÓRIOS DO CONTROLE.....	53
FIGURA 16 - MET DE APRESSÓRIOS DO TRATAMENTO COM CARPROPAMIDA.....	55
FIGURA 17 - PLACA DE CULTURA DE <i>C. acutatum</i>	56

FIGURA 18 - MEV EM BAIXO VÁCUO DA CULTURA DE BDA.....	58
FIGURA 19 - ANÁLISE DA CONIDIOGÊNESE ATRAVÉS DE DIC.....	59
FIGURA 20 - MET DA CULTURA EM MEIO BDA.....	60
FIGURA 21 - FORMAÇÃO DE CONÍDIOS SECUNDÁRIOS EM MICROSCOPIA DE LUZ.....	62
FIGURA 22 - MEV DE BAIXO VÁCUO DE CONÍDIO GERMINADO.....	64
FIGURA 23 - FORMAÇÃO DE CONÍDIOS SECUNDÁRIOS EM MEV.....	64
FIGURA 24 - RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL DE CONÍDIO GERMINADO.....	66
FIGURA 25 - INTERNALIZAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS PELOS VACÚOLOS DURANTE A GERMINAÇÃO E FORMAÇÃO DE CONÍDIOS SECUNDÁRIOS.....	67
FIGURA 26 - VACÚOLOS VISTOS ATRAVÉS DE MARCAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA.....	68
FIGURA 27 - CORPOS LIPÍDICOS EM CONÍDIOS DURANTE O ENVELHECIMENTO.....	70
FIGURA 28 - VACÚOLOS DE CONÍDIOS DURANTE O ENVELHECIMENTO.....	71
FIGURA 29 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS CONÍDIOS JOVENS E VELHOS	72
FIGURA 30 - MET DE CONÍDIOS NÃO GERMINADOS TRATADOS COM PMSF.....	74

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

TABELA 1 - PERFIL DE GERMINAÇÃO EM 24 HORAS DE INCUBAÇÃO COM INIBIDOR DE MELANIZAÇÃO.....	41
TABELA 2 - PERFIL DE GERMINAÇÃO EM 48 HORAS DE INCUBAÇÃO COM INIBIDOR DE MELANIZAÇÃO.....	42
TABELA 3 - CONTEÚDO LIPÍDICO DOS CONÍDIOS GERMINADOS.....	45
GRÁFICO 1 - EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA GERMINAÇÃO COM INIBIDOR DE MELANIZAÇÃO.....	43

LISTA DE FILMES

FILME 1 - CONÍDIO NÃO GERMINADO TRATADO COM CARPROPAMIDA

FILME 2 - VISÃO TRIDIMENSIONAL DOS CORPOS LIPÍDICOS NOS CONÍDIOS
GERMINADO E SECUNDÁRIO

FILME 3 - DISTRIBUIÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS NOS CONÍDIOS GERMINADO
E SECUNDÁRIO

FILME 4 - VACÚOLOS DE CONÍDIO NÃO GERMINADO

FILME 5 - VACÚOLOS DE CONÍDIO NÃO GERMINADO TRATADO COM PMSF

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: Análise de variância

BDA: Batata-dextrose-ágar

DIC: Contraste de interferência diferencial

DHN-melanina: Dihidroxinaftaleno-melanina

DOPA-melanina: Dihidroxifenilalanina-melanina

LA: Laranja de acridina

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

PMSF: Fluoreto de fenil-metil-sulfonil

THN: Tetra-hidroxi-naftaleno

VN: Vermelho Nilo

RESUMO

A antracnose causada por espécies de *Colletotrichum* afeta uma variedade de importantes plantações pelo mundo. Fungos fitopatogênicos desse gênero apresentam apressórios melanizados, vacúolos e corpos lipídicos no citoplasma. A melanização do apressório e a digestão dos triacilgliceróis dos lipídeos armazenados têm sido descritas como vitais para a germinação e penetração do hospedeiro. No presente trabalho, foi utilizado um inibidor de síntese de melanina (a carpropamida) para estudar a germinação e penetração de *Colletotrichum acutatum* em membranas de celofane. Este composto foi eficiente e produziu apressórios hialinos. Ao contrário do esperado, a ausência de melanização não impediu a penetração do apressório, diferindo do que tem sido demonstrado para outros fungos fitopatogênicos, nos quais a melanina é crucial para a penetração do apressório. As análises ultraestruturais demonstraram espessa camada contínua e eletrodensa, provavelmente de melanina, nas paredes celulares dos apressórios das células controle, que não foi encontrada nos apressórios hialinos. Os apressórios das células do controle e do tratamento apresentaram grânulos eletrodensos no citoplasma e na parede celular, em possível processo secretório de natureza ainda desconhecida. Da mesma forma, em ambos os casos foi observada abundante matriz extracelular ao redor dos apressórios através de DIC (contraste de interferência diferencial) e microscopia eletrônica de varredura. Através de análise de imagem foi medido o conteúdo de lipídeos nos conídios germinados e estruturas de infecção de apressórios hialinos controle e tratados. Estes resultados sugerem, dentre outras possibilidades, que os conídios possam metabolizar e aproveitar os esqueletos de carbono do composto adicionado. Em todas as situações de germinação estudadas observou-se a formação de conídios secundários. Análises destas células coradas com vermelho Nilo e laranja de acridina e observadas em microscopia confocal revelaram que o armazenamento de corpos lipídicos e a reorganização de pequenos vacúolos dentro do conídio secundário acontecem simultaneamente à vacuolização e diminuição de corpos lipídicos no conídio germinado. Depois de formado, o conídio secundário apresentou aspecto morfológico semelhante ao conídio não germinado a partir do qual se originou. Lipídeos e vacúolos também foram investigados durante o envelhecimento dos conídios através de microscopia confocal e eletrônica de transmissão. Os resultados demonstraram que os corpos lipídicos desaparecem do citoplasma concomitantemente com a vacuolização durante o envelhecimento. Estes vacúolos realizaram autofagia, demonstrada usando um inibidor de protease vacuolar. A autofagia de corpos lipídicos e outras estruturas celulares também foi verificada em conídios germinados e apressórios. O conjunto de resultados reforça a idéia de que o conhecimento dos mecanismos envolvidos na produção de esporos, germinação e infecção do hospedeiro pode ajudar na elaboração de estratégias de controle desse fungo.

Palavras-chave: Conídios; melanina; corpos lipídicos; autofagia.

ABSTRACT

Anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. affects a variety of economically important crops around the world. Phytopathogenic fungi of this genus show melanized appressoria, vacuoles and lipid bodies in the cytoplasm. Appressoria melanization and triacylglycerol digestion of the lipid bodies have been reported as crucial for germination and penetration of the host. In the present work, it was used an inhibitor of melanin biosynthesis (carpropamid) to study germination and penetration by *Colletotrichum acutatum* on cellophane membranes. This substance led to the development of hyaline appressoria. Contrary to the expected, the lack of melanization did not prevent appressoria from penetrating cellophane membranes, differing from what has been demonstrated for other phytopathogenic fungi, in which melanin is crucial to appressorial penetration. Ultrastructural analysis demonstrated a thick and electron dense layer, probably melanin, in appressoria cell walls of control cells, which was not found in hyaline appressoria. Appressoria of control and carpropamid treated cells showed electron dense granules in the cytoplasm and in the cell wall, in a possible secretory process of a still unknown nature. Likewise, in both cases a large amount of extracellular matrix was observed around appressoria using differential interference contrast (DIC) and scanning electron microscopy. The lipid content in germinated conidia and infection structures from hyaline appressorium was measured in control and treated cells with image analysis. The results suggest, among other possibilities, that conidia can use the compound added (carpropamid) as a carbon source. In all situations of germination studied here, secondary conidia formation was observed. Analysis by confocal microscopy of cells stained with Nile red and acridine orange revealed that the storage of lipid bodies and reorganization of small vacuoles inside the secondary conidium happen simultaneously with the vacuolization and decrease in lipid bodies in the germinated conidium. After being formed the secondary conidium displayed a morphological aspect similar to the nongerminated conidium from which it was originated. Lipids and vacuoles were also investigated during conidia aging using confocal microscopy and transmission electron microscopy. The results demonstrated that lipid bodies disappeared from the cytoplasm concurrently with vacuolization during aging. Autophagy in these vacuoles was demonstrated using a vacuolar protease inhibitor. Autophagy of lipid bodies and other cellular structures was also verified in germinated conidia and appressoria. All these results reinforce the idea that the unraveling of the mechanisms involved in spores production, germination and infection of the host may help in the construction of control strategies of this fungus.

Key-words: Conidia; melanin; lipid bodies; autophagy.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Colletotrichum*, pertencente ao filo ou divisão Ascomycota, inclui alguns dos principais fungos fitopatogênicos e causa prejuízos econômicos em plantações por todo o mundo (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004). *Colletotrichum acutatum* é uma das espécies mais patogênicas deste gênero e possui amplo número de hospedeiros, como amêndoas (ADASKAVEG; HARTIN, 1997), abacate (FREEMAN, 2000), pêssego (ADASKAVEG; HARTIN, 1997), manga (ARAUZ, 2000), azeitona (MARTÍN; GARCÍA-FIGUERES, 1999) e morango (HOWARD et al., 1992). No morango, *C. acutatum* é responsável pela antracnose, doença que pode afetar as diversas partes da planta (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004), mas que causa uma perda mais significativa quando afeta os frutos (BAILEY; JEDER, 1992). Nos frutos maduros *C. acutatum* forma depressões escuras, que são as lesões típicas da antracnose (BAILEY et al., 1992). A compreensão das características da germinação do fungo, os fatores relacionados à formação das estruturas de infecção, colonização do tecido hospedeiro e a produção de esporos (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004) pode auxiliar na elaboração de estratégias de controle desta doença.

Muitos fungos fitopatogênicos produzem melaninas, as quais representam direta ou indiretamente um importante papel no processo de infecção (BUTLER; GARDINER; DAY, 2005). As propriedades da melanina proporcionam aos organismos proteção contra diversos fatores ambientais, como radiação UV e altas temperaturas (REHNSTROM; FREE, 1996; JACOBSON, 2000). Em espécies de *Colletotrichum* e *Magnaporthe grisea* está descrita sua importância na diminuição da permeabilidade do apressório para a formação da pressão de turgor necessária para o processo de penetração da epiderme da planta (MONEY; HOWARD, 1996; THINES; WEBER; TALBOT, 2000). Tem sido amplamente relatado que apressórios hialinos de fungos mutantes são incapazes de penetrar no hospedeiro e estabelecer a infecção (SUZUKI et al., 1982; KUBO et al., 1983; KIM et al., 1998). Esclarecer o papel da melanização no processo de penetração de membranas por *C. acutatum* pode contribuir para entender a virulência deste patógeno.

A penetração no hospederio depende também da digestão dos corpos lipídicos armazenados no citoplasma, característica comum em conídios de espécies

de *Colletotrichum* (MIMS et al., 1995; SCHADECK; LEITE; BUCHI, 1998a). A digestão dos triacilgliceróis armazenados nos corpos lipídicos é vital para suprir a demanda energética e de substratos para processos de síntese durante a germinação (WEETE, 1984). Além disso, produz glicerol que, juntamente com a melanina, seria responsável pela pressão de turgor necessária para o processo de penetração (THINES; WEBER; TALBOT, 2000).

Os corpos lipídicos são internalizados e digeridos nos vacúolos (THINES; WEBER; TALBOT, 2000), organelas encontradas em conídios e nas demais estruturas de infecção formadas durante a germinação (MIMS et al., 1995; SCHADECK; BUCHI; LEITE, 1998b). Os vacúolos desempenham um papel essencial na fisiologia das células fúngicas e são o destino final de estruturas endógenas, através da autofagia, e de moléculas exógenas (ATKINSON; DANIELS; READ, 2002; SCHADECK et al., 2003).

A autofagia e a digestão de reservas nutricionais adquirem grande importância em conídios do gênero *Colletotrichum*, uma vez que estes são capazes de germinar na presença somente de água (LEITE; NICHOLSON, 1992). A conidiação secundária também pode ocorrer na presença somente de água (LEANDRO et al., 2001). Este processo está descrito em espécies de *Colletotrichum* (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004) e caracteriza-se pelo desenvolvimento de conídios secundários diretamente do conídio inicial, concomitantemente com a formação de tubo germinativo e/ou apressório (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; LEANDRO et al., 2001). Os conídios secundários funcionam como uma fonte de inóculo para infecções posteriores (LEANDRO et al., 2001). Conhecer as mudanças celulares nos vacúolos e corpos lipídicos durante a germinação e formação de conídios secundários pode fornecer importantes subsídios para uma compreensão mais ampla dos processos vitais relacionados à germinação de fungos.

Da mesma forma, os corpos lipídicos e vacúolos são aspectos essenciais do envelhecimento nestas espécies. Estudos prévios com *Colletotrichum graminicola* demonstraram que acontece diminuição de corpos lipídicos durante o envelhecimento dos conídios simultaneamente com a intensa vacuolização do citoplasma (MIMS et al., 1995). Nesse contexto, o presente trabalho visa também

caracterizar os vacúolos e corpos lipídicos durante o envelhecimento de conídios de *C. acutatum* e demonstrar a ocorrência de autofagia nessas células.

Em síntese, nesta dissertação são investigados alguns pontos chaves da biologia de *C. acutatum* importantes para o seu sucesso como fitopatógeno. Entre eles o papel da melanina na penetração, a mobilização dos corpos lipídicos e a função vacuolar durante os processos de germinação, conidiação secundária e senescência do conídio.

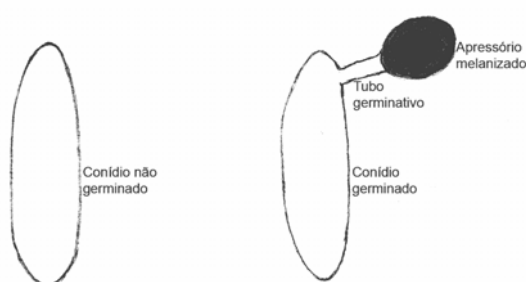
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA GERMINAÇÃO E INFECÇÃO

2.1.1 Germinação e Penetração da Planta Hospedeira

No meio ambiente, a infecção pelo fungo tem início no contato do hospedeiro com os conídios trazidos pelo ar ou pela água. Em condições adequadas de ar e umidade os conídios aderem à superfície hospedeira e iniciam o processo germinativo (OSHEROV; MAY, 2001). Forma-se então o tubo germinativo, de extensão variável e, quando a sua extremidade conecta-se à superfície apropriada, pode se diferenciar no apressório (GRIFFIN, 1994).

FIGURA 1 – GERMINAÇÃO E FORMAÇÃO DE APRESSÓRIOS EM *C. acutatum*



Em espécies de *Colletotrichum*, apesar de alguns autores haverem descrito a ocorrência de penetração independente do apressório, através dos estômatos (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004) ou ferimentos (ZULFIQAR; BRLANSKY; TIMMER, 1996), o processo de penetração geralmente envolve o desenvolvimento de apressórios melanizados (PERFECT et al., 1999). O apressório é uma estrutura de infecção especializada, na base da qual existe um poro de onde se projeta a hifa de infecção ou penetração. A primeira barreira a ser transposta pela hifa de penetração é a cutícula, que contém cutina, seguida pela parede das células vegetais (KÖLLER, 1991). Após a penetração no tecido hospedeiro, forma-se a vesícula de infecção e então a hifa primária (MENDGEN; DEISING, 1993; THINES; WEBER; TALBOT, 2000). A partir daí ocorre a colonização do tecido hospedeiro.

Dois tipos de colonização pelo gênero *Colletotrichum* podem se desenvolver na planta: intracelular hemibiotrófica e subcuticular intramural necrotrófica. Na

colonização intracelular hemibiotrófica, as vesículas de infecção se formam no lúmen das células epiteliais (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004), e após inicialmente se nutrirem de células vivas do hospedeiro passam para a fase necrotrófica, sendo por isso chamada de hemibiotrófica (PERFECT et al., 1999). Já na colonização subcuticular intramural necrotrófica, a penetração da cutícula é seguida pelo desenvolvimento de hifas dentro da cutícula e parede celular epidérmica, e só depois acontece a proliferação rápida através do tecido, que aí sim pode formar hifas entre e dentro do lúmen celular, acompanhada de morte das células hospedeiras (PERFECT et al., 1999). Estudos indicam que a estratégia de infecção adotada por *C. acutatum* depende do hospedeiro a ser colonizado (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004). Assim, no morango *C. acutatum* segue a colonização subcuticular intramural necrotrófica, enquanto que em amêndoas o fungo parece adotar ambas as estratégias de infecção (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004).

2.2 CORPOS LIPÍDICOS

A maioria das células fúngicas contém pelo menos alguns corpos lipídicos, inclusões citoplasmáticas não ligadas à membrana e que variam muito em sua morfologia (MURPHY, 2001). Eles podem estar na forma de gotículas esferoidais, que variam de 0,1 a 50 μm (MURPHY, 2001). Corpos lipídicos purificados de *Saccharomyces cerevisiae* são formados de um centro de lipídeo neutro contendo quase a mesma quantidade de triacilgliceróis e ésteres de esteróis envolvidos por uma monocamada de proteína/fosfolipídeo (MURPHY, 2001). Os corpos lipídicos podem ser observados através de microscopia eletrônica e de luz utilizando-se coloração específica (LOPES, 2004).

Em espécies de *Colletotrichum*, os corpos lipídicos são a reserva mais abundante nos conídios não germinados (KERRIGAN; MIMS, 1993; MIMS et al., 1995). Os lipídeos armazenados praticamente desaparecem dos conídios de *C. graminicola* durante a formação do tubo germinativo e apressório (SCHADECK; BUCHI; LEITE, 1998b).

Apesar do interesse econômico pelos fungos, seus lipídeos e enzimas relacionadas, sabe-se relativamente pouco sobre o mecanismo de biogênese dos

lipídeos nesses organismos (MURPHY, 2001). Os estudos mais detalhados têm sido realizados em *S. cerevisiae*, cujas células não acumulam altos níveis de corpos lipídicos, portanto, a extrapolação dos dados disponíveis para outros fungos que possuem maior conteúdo lipídico ainda é inconsistente (MURPHY, 2001). Já o fungo filamentoso *Mortierella ramanniana* pode acumular grandes concentrações de corpos lipídicos no citosol, com diâmetro entre 1-3 μm (MURPHY, 2001). Ainda assim, os mecanismos celulares envolvidos na formação dos corpos lipídicos e a relação deste processo com outro processo de tráfego de lipídeos e membranas permanecem pouco compreendidos para qualquer organismo (MURPHY, 2001). Uma técnica que promete elucidar o tráfego subcelular de lipídeos é o uso de marcadores fluorescentes em combinação com microscopia confocal, como recentemente aplicado em *M. ramanniana* (MURPHY, 2001). Este método permite a visualização dos corpos lipídicos com o corante fluorescente vermelho Nilo.

2.2.1 Ultraestrutura dos Corpos Lipídicos

Inúmeros estudos ultraestruturais em fungos são realizados com crio-fixação, método que tem demonstrado melhores resultados na preservação da maior parte das estruturas intracelulares dos fungos (MIMS, 1991). A fixação química convencional tem sido preterida, pois produz menor preservação dos detalhes ultraestruturais (MIMS, 1991). Entretanto, a crio-fixação remove totalmente os lipídeos do citoplasma. Portanto, embora ideal para a preservação da maioria das estruturas celulares, não é adequada para estudo de corpos lipídicos. MURPHY (2001) descreve o cuidado que deve ser adotado quando se fixa e cora preparações contendo estruturas potencialmente lábeis como os corpos lipídicos. Logo, é importante que se padronize uma metodologia de processamento para microscopia eletrônica de transmissão (MET) que permita a observação destas organelas a nível ultraestrutural.

2.2.2 Mobilização de Lipídeos e Infecção

Imagens de MET de conídios de *Colletotrichum* demonstraram o citoplasma repleto de corpos lipídicos (KERRIGAN; MIMS, 1993; MIMS et al., 1995;

SCHADECK; BUCHI; LEITE, 1998b). Os conídios do gênero *Colletotrichum* são capazes de germinar na presença somente de água (LEITE; NICHOLSON, 1992). Isso demonstra que suas reservas internas são suficientes para prover todas as moléculas necessárias para o processo germinativo. Além disso, a mobilização dos corpos lipídicos que ocorre durante a germinação (SCHADECK; LEITE; BUCHI, 1998a) é essencial para a penetração de certos fungos (THINES; WEBER; TALBOT, 2000).

Os triacilgliceróis, armazenados nos corpos lipídicos, são hidrolisados, como demonstrado em *M. grisea*, produzindo glicerol e ácidos graxos (THINES; WEBER; TALBOT, 2000). Os ácidos graxos são utilizados nas diferentes rotas bioquímicas de transformação de energia e na formação de substratos para atividades de síntese (através do ciclo do glioxalato), suprimindo grande parte das necessidades do acelerado metabolismo da germinação (WEETE, 1984). O outro produto da digestão, o glicerol, acumula-se no apressório e é responsável pela pressão de turgor necessária para o processo de penetração do hospedeiro (THINES; WEBER; TALBOT, 2000), conforme será explicado adiante (ver item 2.3.4). Devido a este fato, a formação de corpos lipídicos passou ser apontada como fator de virulência (THINES; WEBER; TALBOT, 2000). Logo, quer seja pela participação no metabolismo primário, quer seja pela geração da pressão de turgor, a digestão intracelular dos lipídeos é vital para o sucesso da infecção, tanto que mutantes de *M. grisea* que apresentam degradação dos lipídeos retardada não apresentam pressão de turgor e não são patogênicos (THINES; WEBER; TALBOT, 2000).

2.3 MELANINA E SUAS FUNÇÕES BIOLÓGICAS

2.3.1 Biossíntese e Localização

Melaninas são pigmentos de alto peso molecular, formados por polimerização oxidativa de componentes fenólicos e indólicos, e geralmente apresentam coloração marrom escuro ou preta (JACOBSON, 2000). O que define a unidade estrutural básica das melaninas é geralmente a presença de compostos indólicos ligados covalentemente (RILEY, 1997).

As melaninas fúngicas são incorporadas à camada mais externa das paredes celulares de hifas e células de levedura, ou podem ser depositadas como uma camada interna na parede celular (HENSON; BUTLER; DAY, 1999). Na parede celular dos apressórios a melanina é depositada em uma camada distinta (BOURETT; HOWARD, 1990). Recentemente foi descrita a presença de melanina também na matriz extracelular de células germinadas de *Botrytis cinerea* (DOSS et al., 2003).

Em fungos, as melaninas predominantes são as derivadas das moléculas precursoras de dihidroxinaftaleno (DHN-melaninas) e de dihidroxifenilalanina (DOPA-melanina) (LANGFELDER et al., 2003). No gênero *Colletotrichum* foi identificada apenas DHN-melanina (KUBO; FURUSAWA, 1991).

A DHN-melanina é produzida através da chamada via biossintética policetídea, a qual tem sido amplamente estudada em *Wangiella dermatitidis* (WHEELER; STIPANOVIC, 1985; JACOBSON, 2000). Os policetídeos são metabólitos secundários derivados da condensação de unidades de esqueletos carbono de forma similar à biossíntese de ácidos graxos (VARGA et al., 2003). Entre os precursores da via policetídea estão acetil-CoA e malonil-CoA (GEIS; WHEELER; SZANISZLO, 1984; LANGFELDER et al., 2003). Na formação da melanina malonil-CoA é convertido a 1,3,6,8-tetra-hidroxi-naftaleno (THN), o primeiro intermediário conhecido da via (LANGFELDER et al., 2003). Em seguida ocorre a conversão de 1,3,6,8-THN em scitalona, depois em 1,3,8-THN, vermelona e 1,8-DHN e finalmente a melanina (LANGFELDER et al., 2003).

Em animais a síntese de melanina tem sido estudada em detalhes e sabe-se que ela ocorre em organelas chamadas melanosomas (MARKS; SEABRA, 2001). Em fungos, a literatura atual ainda é inconclusiva sobre a presença dessas organelas (LANGFELDER et al., 2003). Trabalhos mais antigos indicavam que a melanização acontecia fora da membrana plasmática, na parede celular do fungo, e depois nas camadas mais externas (WHEELER; BELL, 1988). Recentemente, FRANZEN e colaboradores (1999) demonstraram que a melanina encontrada na parede celular de *Fonsecaea pedrosoi*, patógeno humano, parece ser sintetizada em vesículas citoplasmáticas acídicas, as quais têm sido designadas como estruturas semelhantes à melanosomas. Esta denominação tem sido recentemente aceita na literatura (FRANZEN et al., 1999). SILVA e colaboradores (2005) reafirmam a

associação da síntese de melanina com os melanosomas. Através do isolamento de anticorpos para a melanina de *F. pedrosoi* e o uso de um inibidor da biossíntese de melanina, o autor relatou que a melanina é sintetizada intracelularmente e depois é transportada para a superfície da célula (SILVA et al., 2005). Outra possibilidade é descrita em *Gaeumannomyces graminis*, onde os precursores de melanina são sintetizados no citoplasma e convertidos em melanina nas paredes celulares do apressório, hifopódio ou hifas por oxidases associadas à parede (BELL; WHEELER, 1986; HENSON; BUTLER; DAY, 1999).

2.3.2 Estudos de Melanização por Microscopia

A melanização de estruturas celulares pode ser observada através de diferentes tipos de microscopia. Na microscopia de contraste de interferência diferencial, por exemplo, as células melanizadas são observadas em tonalidades escuras (ALVIANO et al., 2004), assim como através de microscopia de luz (SCHADECK; BUCHI; LEITE, 1998b). Em microscopia de campo claro os apressórios melanizados também são vistos em tonalidades muito escuras, observando-se inclusive um ponto interno claro correspondente ao poro do apressório (DIÉGUEZ-URIBEONDO; FÖRSTER; ADASKAVEG, 2003).

A microscopia eletrônica de transmissão é uma ferramenta que tem sido largamente empregada em estudos de melanização e outras características da biologia celular de fungos. Normalmente observa-se uma camada eletrodensa de melanina depositada na parede celular através de MET (O'CONNELL et al., 1985; VAN DYKE; MIMS, 1991; SCHADECK; LEITE; BUCHI, 1998a), a qual desaparece nos tratamentos com inibidores de melanina (O'CONNELL et al., 1985; VAN DYKE; MIMS, 1991). Contudo, embora muitos estudos de microscopia eletrônica de estruturas melanizadas de fungos estejam descritos na literatura, a localização da melanina nessas estruturas é difícil, pois nem todo material eletrodense é melanina, e a melanina nem sempre é o material mais eletrodense nas eletromicrografias (HENSON; BUTLER; DAY, 1999). Por exemplo, a camada de melanina é menos eletrodensa que as inclusões intracelulares escuras encontradas em hifopódios (células lobadas e melanizadas similares aos apressórios) de *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* (HENSON; BUTLER; DAY, 1999). Nesse caso, ambos

diminuem nas células tratadas com inibidor de síntese de melanina, o que nos levaria a pensar que o material intracelular escuro é melanina. No entanto, não foi observada fusão do material eletrodenso com a parede do hifopódio, e o mesmo não é evidenciado com marcação para melanina. Tais resultados indicam que o conteúdo eletrodenso provavelmente não representa “melanosomas”, mas sim inclusões de osmólitos (HENSON; BUTLER; DAY, 1999).

2.3.3 Funções da Melanina

As melaninas estão entre as mais estáveis, insolúveis e resistentes substâncias bioquímicas, e apresentam ampla distribuição no mundo vivo (RILEY, 1997; JACOBSON, 2000). Uma das propriedades dos polímeros de melanina, o amplo espectro de absorbância, deve-se ao alto grau de conjugação na molécula. Assim, a cor escura desse pigmento é devido ao fato de muito do espectro de luz visível ser absorvido (RILEY, 1997).

Inúmeras funções têm sido atribuídas às melaninas fúngicas, funções baseadas fundamentalmente nas propriedades da melanina (LANGFELDER et al., 2003). Além da influência no armazenamento de água e íons (que será descrito adiante), destaca-se a proteção contra fatores ambientais, tais como radiação ultravioleta, enzimas hidrolíticas, dessecação, congelamento e altas temperaturas (BELL; WHEELER, 1986; REHNSTROM; FREE, 1996; JACOBSON, 2000). Segundo JACOBSON (2000), variedades melanizadas de fungos são mais resistentes à irradiação UV que variedades não melanizadas, como é o caso dos conídios deficientes de melanina de *Alternaria alternata* (KAWAMURA; TSUJIMOTO; TSUGE, 1999). Devido à resistência à radiação UV, esporos melanizados, de qualquer espécie, parecem ser mais infecciosos quando submetidos à luz do sol (JACOBSON, 2000). Conídios não melanizados de *Monilinia fructicola* apesar de continuarem patogênicos, são mais sensíveis a condições ambientais extremas (REHNSTROM; FREE, 1996). A melanina também protege contra o ataque de enzimas líticas, como as produzidas por microorganismos do solo, proporcionando a dormência dos propágulos de fungos durante o inverno (OLD; ROBERTSON, 1970). Além disso, a melanização de fungos tem proporcionado resistência ao calor em alguns casos (REHNSTROM; FREE, 1996), o que pode estar relacionado à captura,

pela melanina, de radicais livres tóxicos que são produzidos na membrana celular como resultado do calor (JACOBSON, 2000). Ainda segundo JACOBSON (2000), a melanina é capaz de oxidar ou reduzir metais, podendo ligar-se a vários metais de transição. Essa propriedade pode ser útil para diminuir a concentração de metais livres, no caso de metais tóxicos, e para criar uma espécie de reservatório para a célula, no caso de metais essenciais (JACOBSON, 2000).

2.3.4 Melanização e Infecção

Para fungos como *M. grisea* e várias espécies de *Colletotrichum* está estabelecido na literatura que, para que a pressão de turgor necessária para o processo de penetração na planta hospedeira aconteça, é necessário que o apressório esteja melanizado (HOWARD; VALENT, 1996; MONEY; HOWARD, 1996; THINES; WEBER; TALBOT, 2000). Acredita-se que a melanina diminui a permeabilidade do apressório e aumenta a resistência mecânica (THINES; WEBER; TALBOT, 2000). Como resultado, um efluxo de moléculas da célula é dificultado, e um gradiente osmótico é formado devido a um aumento na concentração intracelular de glicerol, proveniente da digestão dos triacilgliceróis (HOWARD et al., 1991). Por causa do gradiente osmótico, o influxo de moléculas de água para dentro da célula é acelerado e uma pressão de turgor é gerada, permitindo a perfuração mecânica de uma barreira dura como a epiderme da planta (HOWARD et al., 1991). A pressão de turgor é concentrada em uma pequena área na base do apressório chamada de poro do apressório, a qual não contém melanina (MENDGEN; DEISING, 1993). É através desse poro que emerge a hifa de penetração, a estrutura que diretamente perfura a superfície do hospedeiro (HOWARD; VALENT, 1996). Assim, a melanização do apressório tem sido descrita como um importante fator na determinação da virulência para uma série de fungos (POLAK, 1989; HOWARD; VALENT, 1996; MONEY; HOWARD, 1996; KAWAMURA et al., 1997).

Experimentos com inibidores de síntese de melanina têm demonstrado que o apressório não melanizado não é capaz de penetrar a superfície da planta hospedeira ou de substrato sintético, o mesmo ocorrendo para mutantes com deficiência de melanina (SUZUKI et al., 1982; HOWARD; FERRARI, 1989; CHUMLEY; VALENT, 1990). Mutantes de *M. grisea* (KIM et al., 1998) e

Colletotrichum lagenarium (KUBO et al., 1983; SUZUKI et al., 1982), os quais formam apressório hialino, não puderam penetrar a superfície epidérmica ou a de barreiras, como o celofane. Esse processo foi parcialmente restabelecido com a adição de precursores de melanina, tais como scitalona, vermelona ou 1,8-DHN aos mutantes (KUBO et al., 1983). Da mesma maneira, a ausência de penetração foi observada em *M. grisea* (WOLOSHUK; SISLER, 1982; CHIDA; SISLER, 1987) e *C. lagenarium* (TSUJI et al., 1997) tratados com inibidores de síntese de melanina. Além disso, alguns trabalhos têm mostrado que a expressão de genes envolvidos na biossíntese de melanina de *A. alternata* é capaz de restaurar a melanização do apressório e a patogenicidade em mutantes deficientes de melanina de *C. lagenarium* (TAKANO et al., 1997) e *M. grisea* (KAWAMURA et al., 1997).

Considerando a relação entre melanização do apressório e patogenicidade, as enzimas envolvidas na via biosintética da melanina têm sido um importante alvo para o desenvolvimento de fungicidas (KIM et al., 1998). Entre eles estão o triciclazol e a carpropamida. A carpropamida, produzida pela Bayer, foi desenvolvida para o controle da ferrugem do arroz (JENNINGS et al., 2000) causada por *M. grisea* e é comercialmente chamada de KTU (3616 SC 300, Bayer). A carpropamida constitui um potente inibidor da atividade catalítica da scitalona desidratase, enzima envolvida na via biosintética da melanina (JENNINGS et al., 2000). Dessa forma, a carpropamida inibe a síntese de melanina bloqueando os passos de desidratação entre scitalona e 1,3,8-THN e entre vermelona e 1,8-DHN (KURAHASHI et al., 1997). Ao impedir a melanização do apressório a carpropamida afetaria então a patogenicidade do fungo. TSUJI e colaboradores (1997) reportam a atividade da carpropamida em *C. lagenarium*. Seus resultados revelam que ela inibe a síntese de melanina, e os apressórios hialinos raramente penetram nas membranas de celofane após 48 horas de incubação, demonstrando, portanto, que a melanina é essencial para a penetração do apressório (TSUJI et al., 1997). A carpropamida foi utilizada no presente trabalho com objetivo de estudar a melanização do apressório e a relação da melanização com os processos de penetração do fungo *C. acutatum*.

Enquanto a melanina pode servir como uma camada seletivamente permeável da parede, uma outra abordagem sugere que a quitina ou talvez outros polímeros de parede celular promovam a rigidez do apressório (DEISING et al., 2000). Tal idéia é sustentada por experimentos em *C. graminicola* mostrando que

embora os apressórios formados na presença de um inibidor da síntese de quitina incorporem melanina, as suas paredes não são rígidas o suficiente para resistir à pressão de turgor e estouram (DEISING et al., 2000).

2.3.5 Penetração sem melanização

Para vários fungos fitopatogênicos, a deposição de melanina não é um requisito para virulência (REHNSTROM; FREE, 1996) e pode ser encontrada em diferentes tipos celulares (TAKANO et al., 1997). *M. fructicola* (REHNSTROM; FREE, 1996) e espécies de *Alternaria* e *Cochliobolus* (TAKANO et al., 1997) produzem conídios melanizados e apressórios hialinos. Em *M. fructicola* a melanina não é necessária para a penetração, uma vez que a maior rota de entrada dos conídios germinados na planta é representada por ferimentos, estômatos e folículos capilares (HALL, 1971). Mutantes de *M. fructicola* deficientes em melanina produzem lesões tão grandes quanto as produzidas pelo tipo selvagem (REHNSTROM; FREE, 1996). Assim, para os fungos que produzem outras estruturas melanizadas e apressórios não melanizados e que entram na superfície hospedeira sem penetração direta da cutícula, a melanina não é esperada como um fator preponderante para processo de infecção (REHNSTROM; FREE, 1996).

Embora a melanina não esteja diretamente relacionada à patogenicidade do fungo nesses casos, ela representa uma importante função no ciclo de vida do patógeno e parece ajudar na sobrevivência dos conídios às mudanças ambientais (REHNSTROM; FREE, 1996) (ver item 2.3.3). Assim, nessas situações, acredita-se que a deficiência de melanina seria desvantajosa no campo (HENSON; BUTLER; DAY, 1999), como é para a infecção por muitos fungos que produzem apressório melanizado. Considerando esses fatos, a degradação da melanina ou inibição da sua síntese, tanto nos fungos em que a melanina permite a seus esporos persistirem no meio ambiente, quanto naqueles em que a melanina tem uma função direta no processo de infecção, consiste em uma interessante e proveitosa área de pesquisa (BUTLER; GARDINER; DAY, 2005).

Por outro lado, no gênero *Colletotrichum* a penetração a partir da hifa de penetração formada no poro na base do apressório é a forma mais encontrada

(POLITIS, 1976; SCHADECK; BUCHI; LEITE, 1998b; PERFECT et al., 1999; WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004) (ver item 2.1.1).

2.4 O PAPEL DAS ENZIMAS NA PENETRAÇÃO

Fungos fitopatogênicos secretam enzimas que degradam a parede celular das plantas, como celulasas (MENDGEN; DEISING, 1993; WALTON, 1994) e cutinases (HOWARD; VALENT, 1996). Espécies do gênero *Colletotrichum*, que formam apressórios melanizados, também produzem uma série de enzimas capazes de destruir componentes estruturais de tecidos das plantas (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004). Entre as enzimas mais freqüentes, estão aquelas que degradam carboidratos, e assim dissolvem as paredes celulares, como as celulasas e as que hidrolisam as cutículas, como a cutinases (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004).

Assim, apesar das evidências demonstrando que certos fungos são capazes de penetrar barreiras físicas através da pressão de turgor unicamente (HOWARD et al., 1991), é provável que, em uma variedade de espécies, existam enzimas envolvidas na infecção do hospedeiro (WALTON, 1994; HOWARD; VALENT, 1996). DAVIES e colaboradores (2000) propõem que *Pyrenopeziza brassicae* penetra a cutícula do hospedeiro usando a atividade da cutinase. PASCHOLATI e colaboradores (1992) demonstraram que cutinases encontradas na mucilagem de *C. graminicola* estão envolvidas no processo de infecção, pois o desenvolvimento da doença causada por essa espécie não ocorreu na presença de um inibidor de atividade da cutinase. Apesar da função desta enzima ainda não estar clara, os autores sugerem uma relação com o processo de adesão (PASCHOLATI et al., 1992). Considerando que para a pressão de turgor seja efetiva na penetração é necessário que o apressório esteja firmemente aderido à superfície hospedeira (HOWARD; FERRARI, 1989; HOWARD et al., 1991), sugere-se que a inibição da cutinase impede a adesão do fungo e, conseqüentemente, a penetração (PASCHOLATI et al., 1992). Entretanto, outros autores demonstraram claramente que a cutinase não é determinante para patogenicidade (STAHL; SCHÄFER, 1992; BONNEN; HAMMERSCHMIDT, 1989). Em *C. lagenarium*, o mecanismo enzimático

representado pela cutinase parece não ter um efeito primário na penetração (BONNEN; HAMMERSCHMIDT, 1989).

Enquanto isso, em *Erysiphe graminis*, fungo que produz apressório não melanizado, uma combinação de ação enzimática, especialmente celulase, e força mecânica é empregada para penetração da planta hospedeira (PRYCE-JONES; CARVER; GURR, 1999).

2.5 MATRIZ EXTRACELULAR EM FUNGOS PATOGÊNICOS

O desenvolvimento dos fungos, seja através do crescimento de hifas, germinação ou esporulação, está com frequência acompanhado da presença de matrizes extracelulares (CARVER et al., 1995). Análises ultraestruturais de conídios de diferentes espécies de *Colletotrichum* (*C. lindemuthianum*, *C. truncatum* e *C. graminicola*) mostraram que as paredes celulares dos conídios não germinados e germinados são cobertas com uma camada de material fibrilar, o qual é mais eletrodenso do que a parede celular (VAN DYKE; MIMS, 1991; MIMS et al., 1995). Alguns estudos têm investigado a composição química da matriz extracelular. A matriz extracelular envolvendo os conídios de espécies de *Colletotrichum* tem sido descrita como uma substância solúvel em água e composta de glicoproteínas (SELA BUURLAGE et al., 1991). Em conídios não germinados e germinados de *C. graminicola*, foi detectada a presença de material glicoprotéico, sendo manose o monossacarídeo predominante (SUGUI, 1998).

Alguns autores atribuem à matriz extracelular função de proteção contra dessecação, perda de íons e outros nutrientes essenciais para o fungo, além da proteção contra produtos tóxicos gerados no decorrer do desenvolvimento de lesões (NICHOLSON; HIPSKIND; HANAU, 1989). Além disso, a matriz extracelular também parece estar relacionada à formação de um microambiente no qual determinadas enzimas são secretadas e direcionadas para sítios específicos de invasão (SUGUI, 1998). Uma das classes de enzimas comumente encontrada em matrizes fúngicas é a das esterases não-específicas, sendo a produção de esterases frequentemente associada à produção de cutinases pelos fungos (PASCHOLATI et al., 1992, 1993). Estudos sugerem o envolvimento das cutinases na adesão à superfície hospedeira,

além da função proposta de degradação da cutícula para facilitar a invasão do patógeno (PASCHOLATI et al., 1993). Portanto, enzimas que estão presentes na matriz extracelular cobrindo esporos e tubos germinativos ou são liberadas por essas estruturas, podem contribuir para a adesão e preparação para infecção (MENDGEN; HAHN; DEISING, 1996).

A adesão do esporo à superfície da planta é a primeira característica essencial para o sucesso de um patógeno (NICHOLSON; EPSTEIN, 1991), seguida então da adesão das estruturas de infecção. Pesquisas têm mostrado que conídios não germinados do gênero *Colletotrichum* aderem rapidamente em um grande número de plantas e superfícies artificiais, incluindo celofane e vidro (MERCURE; KUNOH; NICHOLSON, 1995), sugerindo neste caso uma adesão inespecífica. Na medida em que o processo germinativo avança, acontece a secreção, dependente de síntese protéica, de matriz extracelular associada a estruturas como tubos germinativos e apressórios (BRAUN; HOWARD, 1994). De acordo com PERFECT e colaboradores (1999), o processo de maturação do apressório em espécies de *Colletotrichum* envolve a secreção de materiais de matriz extracelular.

2.6 FORMAÇÃO DOS CONÍDIOS

2.6.1 Conidiação Macrocíclica

Espécies de *Colletotrichum* produzem conídios hialinos tipicamente alongados, com extremidades pontudas ou arredondadas (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Os conídios são esporos formados assexuadamente nos lados ou extremidades de uma hifa (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Em termos gerais, o estágio assexual é responsável pela dispersão do fungo (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004). Na conidiação macrocíclica os conídios podem se desenvolver diretamente de hifas somáticas ou de células conidiogênicas especializadas, geralmente formadas em ramificações de hifas, conhecidas como conidióforos (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Os conidióforos variam de curtas ramificações de hifas a longas e emaranhadas ramificações (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Em *Colletotrichum*, os

conídios são produzidos nas fiálides, um tipo de célula conidiogênica onde os conídios são formados com as paredes apenas parcialmente contínuas com a célula conidiogênica (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

Na natureza, a colonização do tecido vegetal pelo fungo está associada com a necrose da célula vegetal e a formação de massas de esporos como os acérvulos (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004). Os acérvulos rompem o tecido da planta quando os conídios se tornam maduros, e estes são liberados em características gotas de mucilagem (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

2.6.2 Conídios Secundários

Além da formação de conídios através da conidiação macrocíclica, os fungos podem produzir conídios através da conidiação microcíclica (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Neste tipo de conidiação ocorre a formação dos chamados conídios secundários a partir dos ditos conídios primários (LEANDRO et al., 2001). De acordo com SMITH e colaboradores (1981), a conidiação microcíclica ou conidiação secundária compreende a formação de um ou mais conídios após a germinação, com pouco ou sem crescimento micelial. A conidiação secundária tem sido descrita em vários fungos, como *Aspergillus niger*, (ANDERSON; SMITH, 1971), e espécies de *Colletotrichum* (SLADE et al., 1987), inclusive *C. acutatum* (LEANDRO et al., 2001). LEANDRO e colaboradores (2001) fizeram o primeiro relato da produção de conídios secundários por *C. acutatum* em folhas de morango sem sintomas da doença.

Segundo LEANDRO e colaboradores (2001), a produção de conídios secundários aumenta o número total de conídios na superfície das folhas ou mesmo de lamínulas, mesmo com o colapso dos conídios primários após 48 horas da inoculação, indicando que a conidiação secundária tem uma significativa contribuição como fonte de inóculo para futuras infecções. Além disso, a observação de conidiação secundária tanto em folhas quanto em lamínulas onde não se verificou o processo de penetração, mostra que este fenômeno pode ocorrer na ausência de penetração e de nutrientes externos (LEANDRO et al., 2001).

A formação de conídios secundários é influenciada por diversos fatores, entre eles aqueles que inibem o desenvolvimento das hifas como a deficiência de

nutrientes e o estresse causado por altas temperaturas (SMITH et al., 1981). Segundo LEANDRO e colaboradores (2001), a formação de conídios secundários em *C. acutatum* pode estar relacionada com inibidores de germinação e desempenha um importante papel para a sobrevivência e multiplicação do fungo. Em fungos entomopatogênicos, o surgimento dos conídios secundários também está associado a condições que inibem o desenvolvimento da hifa e a infecção (DARA; SEMTNER, 1998).

2.6.3 Estudo da Conidiação Microcíclica e Macrocíclica

A despeito da sua importância como modo de dispersão, o desenvolvimento dos conídios secundários tem sido pouco estudado em seus aspectos morfológicos e de arquitetura intracelular. Apesar das microscopias de campo claro e de fase fornecerem algumas informações, estudos mais profundos geralmente requerem MET e microscopia eletrônica de varredura (MEV), técnicas que consomem tempo, especialmente quando um estágio de transição precisa ser observado (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). A MEV tem sido vastamente utilizada no estudo da morfologia de superfície de fitopatógenos (MIMS, 1991). Em alguns casos, os estudos em microscopia eletrônica podem ser substituídos por microscopia de fluorescência, cujos marcadores necessitam de pouca preparação para utilização (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Na determinação de alguns caracteres, como o modo e a seqüência da conidiogênese, a fotografia com um intervalo de tempo ou observações periódicas durante muitas horas pode ser uma abordagem interessante (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

2.7 VACÚOLOS FÚNGICOS

Os vacúolos estão presentes em diferentes estruturas fúngicas, como hifas, esporos e apressórios, e podem exercer várias funções, entre elas: lisosomal, de armazenamento de substâncias, controle da homeostase, do pH e da concentração de íons no citosol (KLIONSKY; HERMAN; EMR, 1990).

O sistema vacuolar tem sido estudado com o auxílio de uma variedade de sondas fluorescentes, que se acumulam no lúmen do vacúolo (COLE; ORLOVICH; ASHFORD, 1998). De acordo com a literatura, os vacúolos podem estar envolvidos em dois tipos de autofagia: microautofagia e macroautofagia (TETER; KLIONSKY, 2000) como será descrito adiante (ver item 2.8.1).

Assim, os vacúolos são considerados o compartimento lítico da célula fúngica e o destino final da via endocítica (SCHADECK et al., 2003), desempenhando importante papel na degradação de componentes macromoleculares (KLIONSKY; HERMAN; EMR, 1990). A digestão intravacuolar é realizada por uma variedade de enzimas hidrolíticas (TETER; KLIONSKY, 2000), sendo a fosfatase ácida uma delas. Esta enzima está demonstrada em vacúolos de *Aspergillus flavus* (BOJOVIC-CVETIC; VUJICIC, 1982), em basidiósporos de *Psilocybe cubensis* (RUCH; MOTTA, 1987), em hifas de *Gigaspora margarita* (SAITO, 1995) e em *C. graminicola* (SCHADECK et al., 2003). Numerosos vacúolos marcados pela reação para fosfatase ácida foram observados em hifas de *Sclerotium rolfii* (HÄNSSLER; MAXWELL, 1975). Os autores consideram estes vacúolos como parte do sistema lisosomal do fungo, também sugerindo que a função primordial destes compartimentos está relacionada com processos catabólicos e mobilização de reservas nutritivas.

Trabalhos em *C. acutatum* demonstraram que os vacúolos formados durante a germinação apresentam fosfatase ácida e são compartimentos com pH ácido (BARBOSA et al., 2004). Além disso, à medida que a germinação progride, os vacúolos aumentam de tamanho, as vesículas no apressório tornam-se maiores, e ambos ficam mais intensamente marcados pela reação para fosfatase ácida, indicando aumento de atividade dessa enzima. (BARBOSA et al., 2004).

Estudos em *M. grisea* com microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão demonstraram a entrada de corpos lipídicos no vacúolo e a sua posterior degradação (WEBER et al., 2001). A internalização e digestão de lipídeos pelos vacúolos também foi demonstrada usando fosfatase ácida como marcador de membrana vacuolar em conídios não germinados de *C. graminicola* (SCHADECK; LEITE; BUCHI, 1998a).

2.8 AUTOFAGIA E ENVELHECIMENTO

2.8.1 Importância da Autofagia

A autofagia é um processo através do qual as células degradam partes de seu citoplasma (TAKESHIGE et al., 1992; MORIYASU; OSHUMI, 1996). Ela desempenha um importante papel durante as mudanças de arquitetura celular que acontecem durante a diferenciação e desenvolvimento em diferentes organismos (LEVINE; KLIONSKY, 2004). Além disso, a carência de nutrientes tem sido descrita como ativadora do processo autofágico (BERGAMINI et al., 2004).

A autofagia foi evidenciada mais de quarenta anos atrás (ASHFORD; PORTER, 1962), mas o conhecimento sobre esse processo sofreu um grande avanço na década passada, especialmente através de estudos genéticos em *S. cerevisiae* (REGGIORI; KLIONSKY, 2005). Apesar de que inúmeros estudos sobre autofagia terem sido realizados em leveduras (REGGIORI; KLIONSKY, 2005), poucos trabalhos têm focado este processo em fungos filamentosos.

A importância do processo autofágico pode ser avaliada em mutantes de leveduras que apresentam autofagia defeituosa e por isso perdem a viabilidade em meio deficiente de nutrientes (TSUKADA; OSHUMI, 1999). De forma semelhante, mutantes que apresentam alterações na autofagia apresentam esporulação defeituosa, sugerindo que a autofagia é pré-requisito para este processo de diferenciação celular (NODA; OHSUMI, 1998). Estudos prévios com *C. graminicola* sugerem que há ativação da autofagia durante a germinação (SCHADECK; LEITE; BUCHI, 1998a; SCHADECK et al., 2003). Esta ativação está em concordância com o consenso geral de que a autofagia tem um papel importante nas mudanças que ocorrem durante a diferenciação e o desenvolvimento em diferentes organismos (LEVINE; KLIONSKY, 2004).

Duas classes de autofagia estão bem estabelecidas: macroautofagia e microautofagia. Na microautofagia componentes do citoplasma são capturados por invaginações ou projeções da membrana do vacúolo e enviados para o lúmen vacuolar (TETER; KLIONSKY, 2000; SCHADECK et al., 2003). Na macroautofagia, organelas ou outras estruturas são capturadas por uma estrutura de dupla membrana especializada, que gera os autofagossomos. Estes então liberam seu

conteúdo no lúmen vacuolar (TETER; KLIONSKY, 2000; SCHADECK et al., 2003). Após a liberação no lúmen vacuolar, as vesículas contendo o material citoplasmático a ser digerido passam a ser denominadas de corpos autofágicos.

Evidências experimentais demonstram que a mobilização dos lipídeos envolve autofagia, uma vez que são internalizados e digeridos em vacúolos (SCHADECK; LEITE; BUCHI, 1998a; THINES; WEBER; TALBOT, 2000). Através de reação citoquímica ultraestrutural foi demonstrado que esta captação se dá por microautofagia (SCHADECK et al., 2003), embora a macroautofagia também possa ocorrer. Logo, a autofagia parece ser duplamente importante durante a germinação de conídios, pois além do papel clássico relacionado à diferenciação e remodelagem celular (LEVINE; KLIONSKY, 2004), no gênero *Colletotrichum* ela também é essencial na mobilização dos corpos lipídicos.

2.8.2 Uso de Inibidores no Estudo da Autofagia

A digestão dos corpos autofágicos depende de proteases lisosomais que atuam sobre suas proteínas de membrana (TAKHESHIGE et al., 1992). A quebra da membrana dos corpos autofágicos, etapa limitante da digestão, expõe o conteúdo às hidrolases lisosomais, o qual é então digerido (THOMPSON; VIERSTRA, 2005).

Em recente revisão sobre métodos no estudo da autofagia, MIZUSHIMA (2004) enfatiza a importância de técnicas microscópicas no estudo da autofagia e a aplicação de inibidores de proteases como o PMSF (fluoreto de fenil-metil-sulfonil), clássico inibidor de serina protease (TAKESHIGE et al., 1992; SAKAI et al., 1998). Normalmente a digestão dos corpos autofágicos é tão rápida que eles são dificilmente visualizados no interior de lisosomas e vacúolos. O emprego de inibidores de proteases bloqueia a digestão dos corpos autofágicos, os quais se acumulam nos vacúolos, permitindo diferentes análises (MIZUSHIMA, 2004). Leveduras tratadas com PMSF, por exemplo, acumulam vesículas intravacuolares quando expostas à deficiência de nutrientes (TAKESHIGE et al., 1992).

3. OBJETIVOS

Geral

- Contribuir para a compreensão da biologia celular de conídios de *Colletotrichum acutatum*.

Específicos

- 1) Estudar a melanização do apressório através do uso da carpropamida, inibidor de síntese de melanina;
- 2) Investigar os efeitos da inibição da síntese de melanina sobre:
 - O percentual de germinação
 - A capacidade de penetração de apressórios hialinos em membranas artificiais
 - A formação de conídios secundários
 - Mobilização de corpos lipídicos
 - Formação de matriz extracelular
 - Ultraestrutura de conídios germinados
- 3) Caracterizar morfológicamente o micélio das culturas de *C. acutatum* e a conidiogênese através de MET, MEV e microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC);
- 4) Caracterizar a formação de conídios secundários em *C. acutatum* com foco na mobilização de lipídeos e vacuolização;
- 5) Caracterizar a dinâmica dos vacúolos e corpos lipídicos durante o envelhecimento e germinação de conídios de *C. acutatum* através de microscopia confocal e MET;
- 6) Verificar a ocorrência de autofagia em conídios de *C. acutatum*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTIVO E GERMINAÇÃO

O fungo *C. acutatum* utilizado neste trabalho foi isolado pela Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Estado do Paraná a partir de morangos doentes coletados em Pinhalão, Paraná, Brasil, a 23°-24° para o sul e 50°-52° para oeste. Foi cultivado em meio BDA (batata-dextrose-água) na temperatura de 26°C, sob condições de iluminação fluorescente com ciclo claro/escuro de 12 horas.

4.1.1 Obtenção dos Conídios Germinados

Dois sistemas principais foram utilizados para a germinação:

1) Superfícies de germinação imersas na suspensão: o volume de 3 mL da suspensão aquosa de conídios ($1,5 \times 10^4$ conídios/mL) foi colocado sobre membranas de celofane (18 x 18 mm) ou lâminulas de vidro depositadas no fundo dos poços de cultura, de maneira a formar uma coluna de suspensão de aproximadamente 2 mm. O material foi então incubado a 26°C, sob condições de iluminação fluorescente e ciclo claro/escuro de 12 horas.

2) Gotas de suspensão sobre superfícies de vidro: este método foi utilizado nos estudos de conídios secundários. O volume de 300 µL de uma suspensão contendo 2×10^5 conídios/mL foi colocada sobre lâminas de vidro e incubada nas condições descritas no item 1 por 24 horas.

4.2 INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE MELANINA E PENETRAÇÃO EM MEMBRANA DE CELOFANE

Foram utilizados conídios cultivados durante 4-5 dias em meio BDA. Os conídios foram incubados sobre membranas de celofane nas condições descritas no item 4.1.1 (1), em presença de carpropamida (KTU - 3616 SC 300, Bayer).

As incubações destinadas às análises estatísticas foram realizadas nas concentrações de 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL (molaridades $2,4 \times 10^{-7}$, $2,4 \times 10^{-6}$, $2,4 \times 10^{-5}$ e $2,4 \times 10^{-4}$ respectivamente), por 24 e 48 horas de acordo com trabalho de TSUJI e colaboradores (1997). Três experimentos em tetraplicatas foram realizados para coleta de dados para análise estatística. As lâminas para contagem foram montadas com uma mistura de etanol e glicerol (1:1). Foram contados 40 campos em cada lâmina, em microscópio Eclipse E200 com objetiva 40X/0.65, totalizando uma média de 100 células por lâmina.

As condições analisadas foram as seguintes: conídios não germinados e conídios germinados. Entre os germinados, foram analisadas a quantidade de apressórios hialinos, de hifas primárias partindo de apressórios hialinos, apressórios melanizados, hifas primárias partindo de apressórios melanizados, tubos germinativos, conídios secundários e apressórios secundários.

Os dados obtidos na contagem de células foram avaliados estatisticamente utilizando-se análise de variância (ANOVA). Comparações com o controle, quando necessárias, foram feitas através do método de Dunnett tendo $\alpha = 0,05$. Os dois períodos de incubação foram comparados através de Teste t. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão.

Em todas as análises morfológicas da inibição da melanização foram utilizadas concentrações de carpropamida que efetivamente inibiam a melanização (0,1 a 100 µg/mL) conforme indicado na legenda dos resultados descritos no capítulo 5.

4.3 INDUÇÃO DA CONIDIOGÊNESE SOBRE LAMÍNULAS DE VIDRO

Os conídios foram germinados sobre lamínula em presença de meio Mc'coy na concentração de 3 µL/mL. Embora em baixa concentração, os nutrientes estimularam o crescimento micelial. Após 24 horas as lamínulas foram observadas através de DIC em microscópio confocal Radiance 2001 (Bio-Rad®) acoplado à Eclipse E-800 (Nikon®) com objetiva com lente de imersão plana-apocromática 60X/1.4 NA.

4.4 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA, CONFOCAL E DIC

Para evitar o surgimento de artefatos que poderiam ser provocados pela pressão da lamínula sobre os conídios, procedeu-se a montagem da lâmina com uso de suportes laterais como descrito por BARBOSA e colaboradores (2006). Um fragmento de fita adesiva foi colocado em cada lado da lâmina, de modo que a lamínula pudesse ser colocada entre eles. Os conídios também foram germinados diretamente sobre a lâmina e neste caso a lamínula também foi colocada utilizando os suportes laterais.

4.5 COLORAÇÃO DE LIPÍDEOS COM VERMELHO NILO

Os conídios foram corados por 5 minutos em solução contendo vermelho Nilo (Sigma) 5 $\mu\text{g/mL}$ (THINES; WEBER; TALBOT, 2000), para analisar o conteúdo lipídico em dois tipos de microscopia:

1) Microscopia confocal (Radiance 2001 (Bio-Rad®) acoplado à Eclipse E-800 (Nikon®) e objetiva com lente de imersão plana-apocromática 60X/1.4 NA). O vermelho Nilo foi excitado utilizando-se o laser verde HeNe de 543 μm e a imagem obtida através do filtro de emissão E600LP. Foi também realizada microscopia de DIC conforme trabalho de FRANZEN e colaboradores (1999).

2) Microscopia de fluorescência (Zeiss Axio-Photo), com filtro de fluorescência Rodamina, e objetiva de imersão de 63X.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDEOS EM CONÍDIOS TRATADOS COM CARPROPAMIDA E SACAROSE

Os conídios foram germinados na presença de 1 $\mu\text{g/mL}$ de carpropamida, sacarose 0,1% e água. A sacarose foi utilizada como um controle positivo da síntese e/ou diminuição do consumo de corpos lipídicos. Os conídios foram incubados por 24 horas sobre lamínulas de vidro, e as lâminas para análise *in vivo* montadas como

explicado no item 4.4. Os lipídeos foram corados por vermelho Nilo (ver item 4.5) e analisados em microscópio de fluorescência. Três experimentos em duplicatas de cada condição foram realizados. Imagens de dez células em cada lâmina foram capturadas, fornecendo um total de sessenta células por tratamento para análise de imagens. Após a captura as imagens foram submetidas à análise no programa de análise de imagens *Image Tool* (UTHSCSA), onde foi medida a área (em micrômetros) dos corpos lipídicos individuais que estavam fluorescentes. Através da soma das áreas de cada um dos corpos lipídicos encontrados em uma célula, obteve-se a área total de lipídeos presente nessa célula. Os valores da área de cada uma das células germinadas, do tratamento e controles, foram analisados através de ANOVA. Valores significativamente diferentes do controle foram definidos através do pós-teste de Dunnett, usando grau de significância $\alpha = 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão.

4.7 IDENTIFICAÇÃO DE VESÍCULAS ÁCIDAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA CONFOCAL

Com o objetivo de analisar os compartimentos ácidos, as preparações de conídios não germinados e germinados foram incubadas com solução aquosa de laranja de acridina (Sigma) 15 $\mu\text{g/mL}$ por 20 minutos e examinadas no microscópio confocal Radiance 2001 (Bio-Rad®) acoplado à Eclipse E-800 (Nikon®). Foi utilizada objetiva com lente de imersão plana-apocromática 60X/1.4 NA e microscopia de interferência diferencial por contraste (DIC) de acordo com trabalho de FRANZEN e colaboradores (1999). Comprimento de onda de excitação: 488 μm , laser de Argônio; Aquisição: dois PMTs, usando 600/50 BLD e filtro de emissão HQ 530/60.

4.8 MEV DE BAIXO VÁCUO DA CULTURA E DE CONÍDIOS GERMINADOS

Um fragmento de aproximadamente 2 mm x 2 mm de uma cultura de três dias foi cortado e fixado de acordo com os protocolos padrões para microscopia

eletrônica, na mistura de Karnovski (tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2; glutaraldeído 2,0%; p-formaldeído 4,0%; CaCl_2 5,0 mM), pelo período de duas horas. Conídios germinados sobre membrana de celofane foram fixados da mesma maneira. Em seguida, o material foi lavado três vezes no tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2. A seguir procedeu-se à desidratação em série crescente de concentrações de soluções aquosas de etanol (etanol 50%, 70%, 95% e 100%). As células foram então submetidas ao ponto crítico observadas ao microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-6360 LV Scanning Electron Microscope) em baixo vácuo.

4.9 MEV DE ALTO VÁCUO

Conídios germinados sobre lamínula de vidro (após 24 horas de incubação) como descrito anteriormente (ver itens 4.1.1 e 4.2.1) também foram fixados na mistura de Karnovski (tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2; glutaraldeído 2,0%; p-formaldeído 4,0%; CaCl_2 5,0 mM), pelo período de duas horas. A seguir, foram lavados três vezes no mesmo tampão. Seguiu-se a fixação em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato pelo período de 1 hora, lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e desidratação em série crescente de concentrações de soluções aquosas de etanol (etanol 50%, 70%, 95% e 100%). Após isto, as células foram submetidas ao ponto crítico e metalização e observadas ao microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-6360 LV Scanning Electron Microscope).

4.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

4.10.1 Obtenção dos Conídios Germinados para MET

Os conídios controle e tratados com carpropamida foram germinados sobre membrana de celofane. Após 24 horas de germinação as membranas foram agitadas em vórtex por 3-5 minutos, para promover a soltura dos conídios das superfícies do celofane. A suspensão resultante foi centrifugada em baixa rotação. O

pellet foi incluído em ágar 1%, e seccionado em fragmentos de aproximadamente 2mm x 2mm x 2mm.

4.10.2 Processamento dos Conídios Germinados e de Fragmentos de Cultura

Os fragmentos de ágar e fragmentos de cultura de 3 dias foram fixados na mistura de Karnovski pelo período de duas horas. A seguir foram lavados três vezes no mesmo tampão, fixados em tetróxido de ósmio 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 pelo período de 1 hora. Na seqüência, foram lavados uma vez em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, duas vezes em água destilada, e então mantidos em uranila aquosa 2% por 2 horas. Após isto, o material foi desidratado em série crescente de concentrações de soluções aquosas de etanol e acetona, infiltrado e emblocado em Epon 812 (LUFT, 1961). A contrastação ocorreu nas células e nos cortes. No primeiro caso com acetato de uranila e no segundo com acetato de uranila 2% (solução aquosa) e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963). A contrastação, quando ocorreu também em corte, não apresentou resultado diferente da contrastação somente em bloco.

4.11 TRATAMENTO COM PMSF

Conídios não germinados de culturas de duas faixas de idade (de 2 a 5 dias e de 10 a 20 dias) foram coletados e incubados na presença de 1 mM de PMSF, inibidor de protease vacuolar, pelo período de 4 horas. Os controles foram incubados nas mesmas condições em presença somente de água. Após os tratamentos as células foram analisadas através de DIC, coradas com vermelho Nilo (ver item 4.5) e laranja de acridina (ver item 4.7) e analisadas através de microscopia confocal. Além disso, células controle e tratadas foram fixados e processados para MET.

4.12 PROCESSAMENTO DE IMAGEM

As imagens de cortes ópticos individuais e a seqüência de seções z LSCM foram capturadas em microscópio confocal através do LaserSharp Software. Neste Software foram feitas projeções e reconstruções tridimensionais. As imagens estáticas foram exportadas para o programa Adobe Photoshop em formato TIF (Tagged-Image File). A aquisição de imagens seriais, em diferentes intervalos de segundos, também foi feita através do Laser Sharp Software. As microfilmagens foram convertidas em AVI (Audio-Video Interleaved File).

Todos os procedimentos necessários para compor as figuras deste trabalho foram feitos no programa Adobe Photoshop, como o corte de células do campo óptico, rotação e adição de marcadores. Em alguns casos o contraste foi incrementado. Outros processamentos especiais utilizados estão indicados nas legendas das figuras.

5. RESULTADOS

5.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DA GERMINAÇÃO NA PRESENÇA DO INIBIDOR DE SÍNTESE DE MELANINA

5.1.1 Penetração em Membranas de Celofane

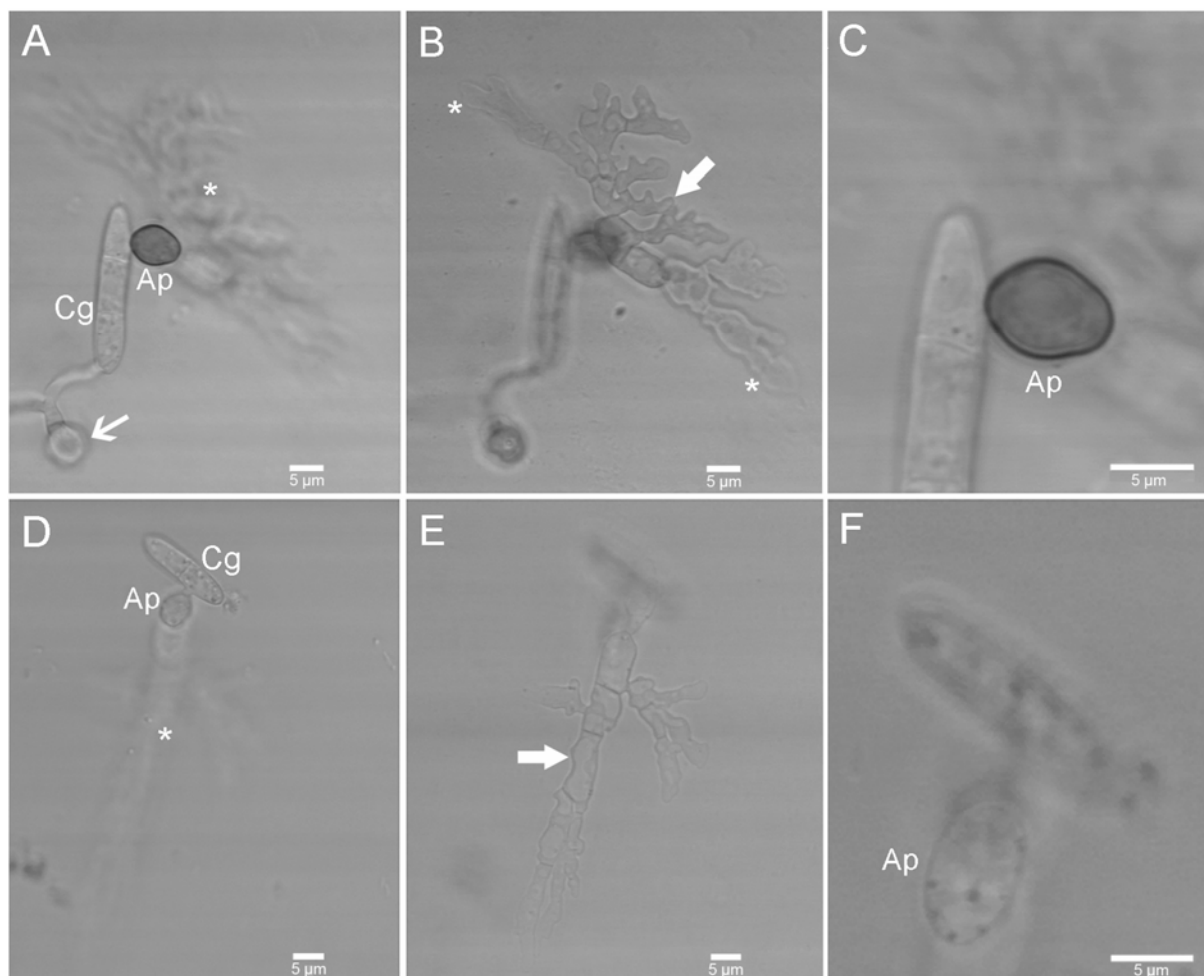
Conídios de *C. acutatum* incubados apenas com água germinaram e formaram apressórios melanizados após 24 e 48 horas de incubação (fig. 2A). Nas condições experimentais foi possível observar a formação e penetração das estruturas de infecção (fig. 2A-B) *in vivo*, sem qualquer marcação. As hifas primárias, estruturas que se formam no interior do hospedeiro com o objetivo de colonizá-lo, foram facilmente visualizadas dentro da membrana de celofane, bastando para isso mudar o plano de foco (fig. 2A-C). Observou-se também a formação de hifas primárias a partir dos apressórios hialinos do controle (fig. 3).

A penetração a partir de apressórios não melanizados foi confirmada através de tratamento com carpropamida, inibidor da síntese de melanina. Os apressórios tratados com carpropamida apresentaram-se completamente hialinos (fig. 2D e 2F), e penetraram na membrana de celofane formando hifas primárias (fig. 2E), a semelhança do apressório melanizado (fig. 2B).

As hifas primárias encontravam-se arranjadas em diferentes planos do celofane, e apresentaram-se ramificadas (fig. 2B e 2E) ou lineares (fig. 5C e 6C) tanto nas células controle quanto nas tratadas com o inibidor de síntese de melanina.

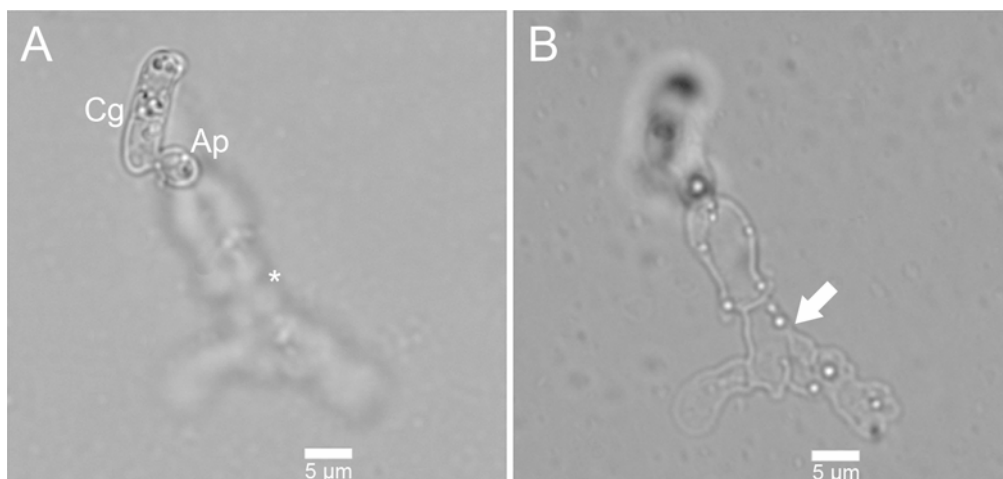
Algumas características permitiram a confirmação da localização da hifa primária dentro do celofane: a) a textura da membrana de celofane, que apresentava seu interior (onde estava a hifa primária) mais granuloso observado em DIC, (figs. 5C e 6C) quando comparado ao meio homogêneo ao redor das estruturas na superfície (figs. 5A e 6A); b) quando o apressório era focalizado no fotomicroscópio, a hifa primária ficava nitidamente abaixo dele; c) as hifas primárias só se formavam quando as células germinavam sobre celofane (sobre vidro elas raramente se formavam); d) nos cortes ópticos das hifas primárias feitos em microscópio confocal não apareciam as granulações de carpropamida que eram observadas na superfície.

FIGURA 2 - PENETRAÇÃO A PARTIR DE APRESSÓRIOS MELANIZADOS E NÃO MELANIZADOS



Análises em DIC após 48 horas de incubação sobre membrana de celofane. A-C: Controle. D-F: Tratamento com 1 µg/mL de carpropamida. A – Observa-se um conídio germinado (Cg) com um apressório melanizado (Ap) e outro apressório fora do foco (seta), além de uma hifa primária fora do foco (asterisco). B – A hifa primária encontra-se bastante ramificada com regiões no foco (seta grossa) e regiões fora do foco (asteriscos). O conídio germinado e o apressório localizados na superfície da membrana de celofane ficaram fora do foco. C – O detalhe do conídio germinado da figura A mostra que o apressório (Ap) está extremamente melanizado. D – Observa-se um conídio germinado (Cg) com apressório hialino (Ap) e sua hifa primária fora do foco (asterisco). E – A hifa primária do apressório hialino também se encontra ramificada (seta). F – O detalhe evidencia o apressório não melanizado (Ap).

FIGURA 3 - PENETRAÇÃO A PARTIR DE APRESSÓRIO HIALINO DO CONTROLE

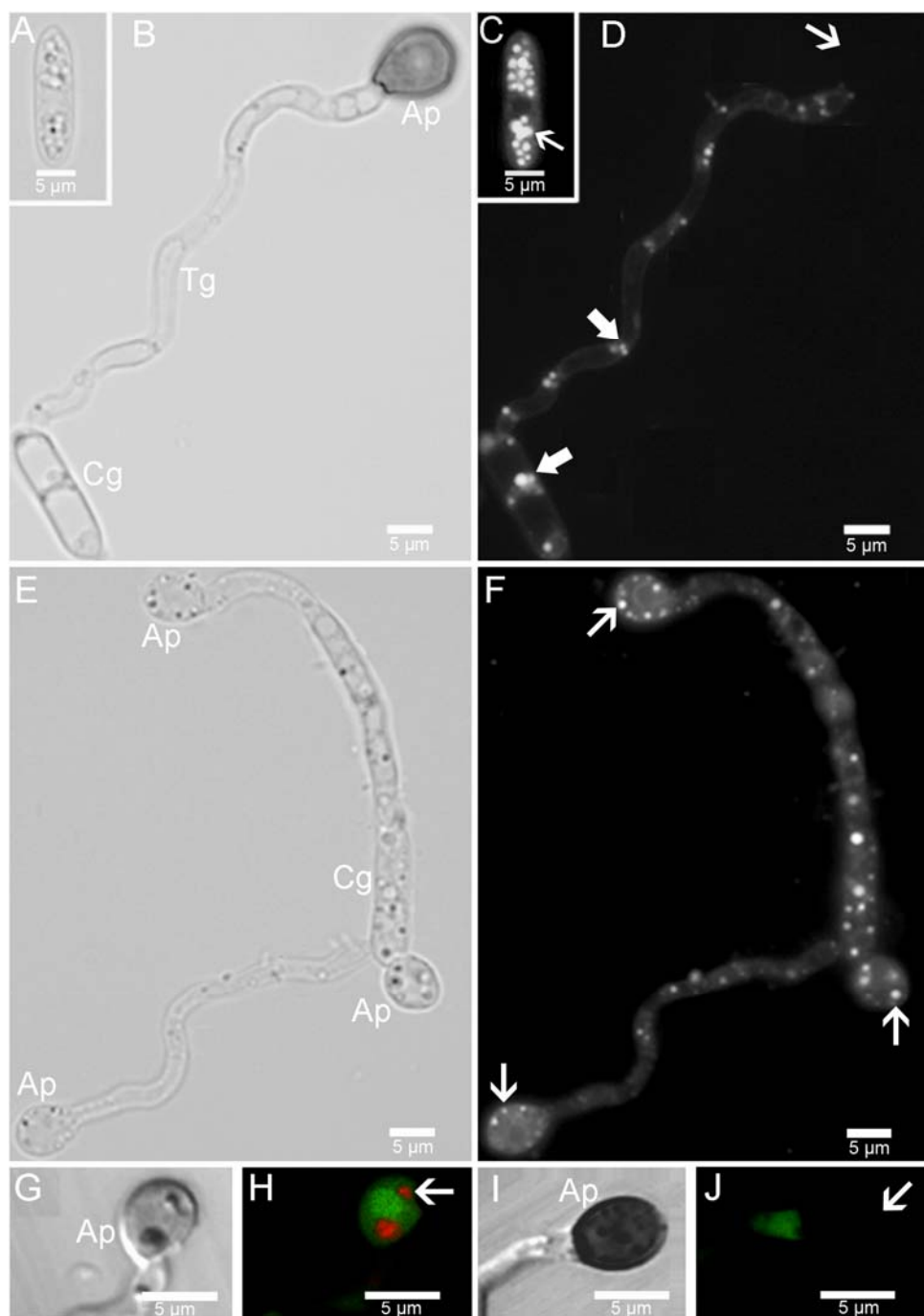


Análise em microscopia de luz de conídio controle com 48 horas de incubação sobre membrana de celofane. A – Observa-se um conídio germinado (Cg) com apressório hialino (Ap) e a hifa primária fora de foco (asterisco). B – Plano de foco da hifa primária ramificada (seta grossa).

5.1.2 Melanização e Bloqueio das Colorações Fluorescentes

O conídio não germinado (de 4-5 dias) estava repleto de corpos lipídicos observados através microscopia de fluorescência (fig. 4A e 4C), confocal (fig. 27A) e MET (fig. 9), os quais diminuíram, em alguns casos quase completamente, após a germinação (fig. 4B e 4D). Os apressórios do controle que pareciam completamente melanizados quando vistos em microscopia de luz (fig. 4B), não estavam visíveis na marcação com vermelho Nilo (fig. 4D). Entretanto, nos apressórios não melanizados (fig. 4E) era possível discernir a célula com uma leve fluorescência de fundo e corpos lipídicos bem definidos, arredondados e muito fluorescentes devido à coloração com com vermelho Nilo (fig. 4F). O bloqueio da visualização da fluorescência em apressórios melanizados também foi observado em vesículas ácidas coradas com laranja de acridina. Estes compartimentos eram visualizados em apressórios hialinos (fig. 4G-H) e não o eram em apressórios melanizados (fig. 4I-J). O conjunto destes resultados indica que o bloqueio da fluorescência pode servir como parâmetro para identificar a completa melanização do apressório.

FIGURA 4 - COLORAÇÃO COM VERMELHO NILO E LARANJA DE ACRIDINA DE CONÍDIOS COM APRESSÓRIOS MELANIZADOS E NÃO MELANIZADOS



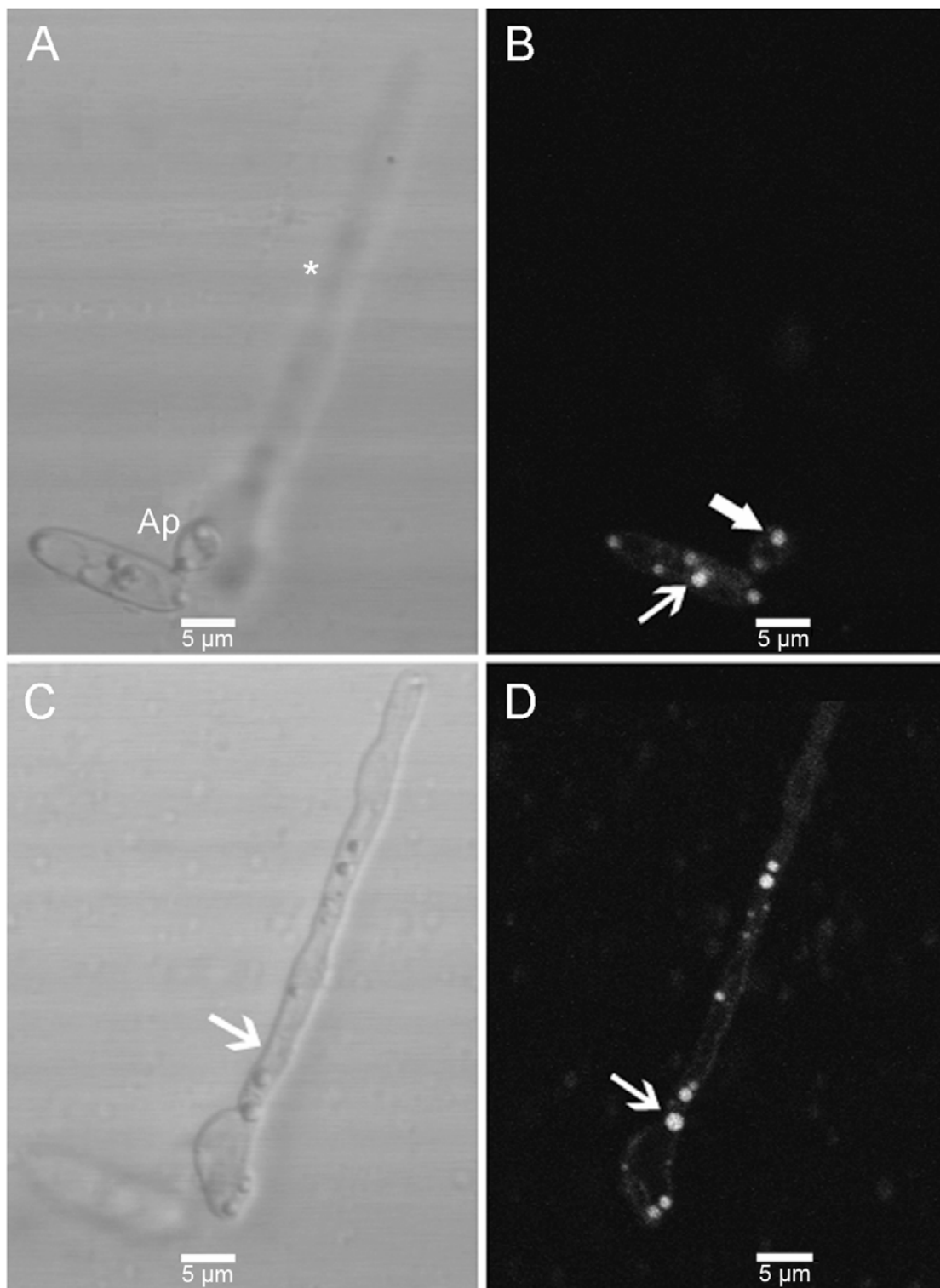
A-B e E: Microscopia de luz. C-D e F: Coloração com vermelho Nilo (VN). A-D: Células do controle. E-F: Inibição da melanização com 1 µg/mL de carpropamida. A – Conídio não germinado. B – Conídio germinado (Cg) com longo tubo germinativo (Tg) e apressório (Ap) melanizado. C – Conídio não germinado com corpos lipídicos (seta). D – Corpos lipídicos são verificados no conídio germinado e tubo germinativo (setas grossas) enquanto no apressório não são visualizados (seta fina). E – Conídio germinado (Cg) com três apressórios (Ap) não melanizados. F – Nos apressórios não melanizados é possível visualizar os corpos lipídicos (setas). G-J: Apressórios de conídios controle corados com LA. G e I: Imagens em DIC. H e J: Imagens de microscopia confocal (coloração: LA). G – Apressório (Ap) não melanizado. H – Vesículas coradas (setas) são vistas no interior do apressório não melanizado. I – Apesssório (Ap) melanizado. J – Não foi observada fluorescência na região do apressório melanizado (seta). Todas as células foram germinadas sobre lamínulas de vidro.

5.1.3 Distribuição dos Corpos Lipídicos Durante a Germinação e Penetração

Através de microscopia confocal os corpos lipídicos foram facilmente visualizados, tanto em células controle (fig. 5) como em células tratadas com carpropamida (fig. 6). A presença dos corpos lipídicos na hifa primária, observadas em cortes ópticos no interior do celofane (figs. 5D e 6D), confirmou a penetração a partir de apressórios hialinos.

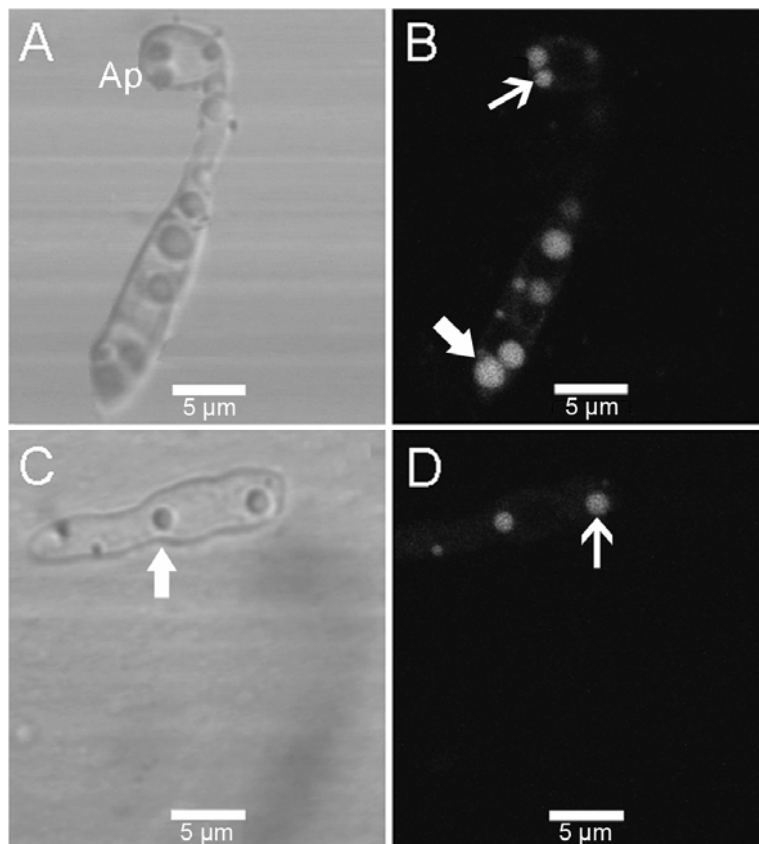
As imagens em microscopia de fluorescência e confocal dos conídios e das estruturas de infecção (tubos germinativos, apressórios e hifas primárias) do controle indicaram poucos e pequenos corpos lipídicos (figs. 4D, 5B e 5D). Ao contrário, os conídios tratados com carpropamida pareciam apresentar maior quantidade de corpos lipídicos no conídio germinado e nas estruturas de infecção (figs. 4F, 6B e 6D), mesmo após completamente formadas. Muitas vezes os corpos lipídicos pareciam ser maiores em diâmetro nos conídios incubados com carpropamida quando comparados ao controle (figs. 6B e 6D). Assim, as imagens sugeriram que o tratamento com carpropamida afetava o consumo dos corpos lipídicos durante a germinação. Esta hipótese foi confirmada através de análise de imagem (tabela 3) descrita no item 5.1.6.

FIGURA 5 - CORPOS LIPÍDICOS E PENETRAÇÃO A PARTIR DE APRESSÓRIOS HIALINOS DO CONTROLE



Conídios incubados por 48 horas na presença apenas de água. Coluna da esquerda: Análises de DIC. Coluna da direita: Coloração com VN em microscópio confocal. A – Observa-se um conídio germinado com apressório não melanizado (Ap) e sua hifa primária fora de foco (asterisco). B – Corpos lipídicos no conídio (seta fina) e apressório (seta grossa) são visualizados. C – Observa-se a hifa primária do apressório visto em A no plano de foco dentro do celofane (seta). D – É possível verificar a presença de alguns corpos lipídicos na hifa primária (seta).

FIGURA 6 - CORPOS LIPÍDICOS, INIBIÇÃO DA MELANIZAÇÃO E PENETRAÇÃO NA PRESENÇA DE CARPROPAMIDA



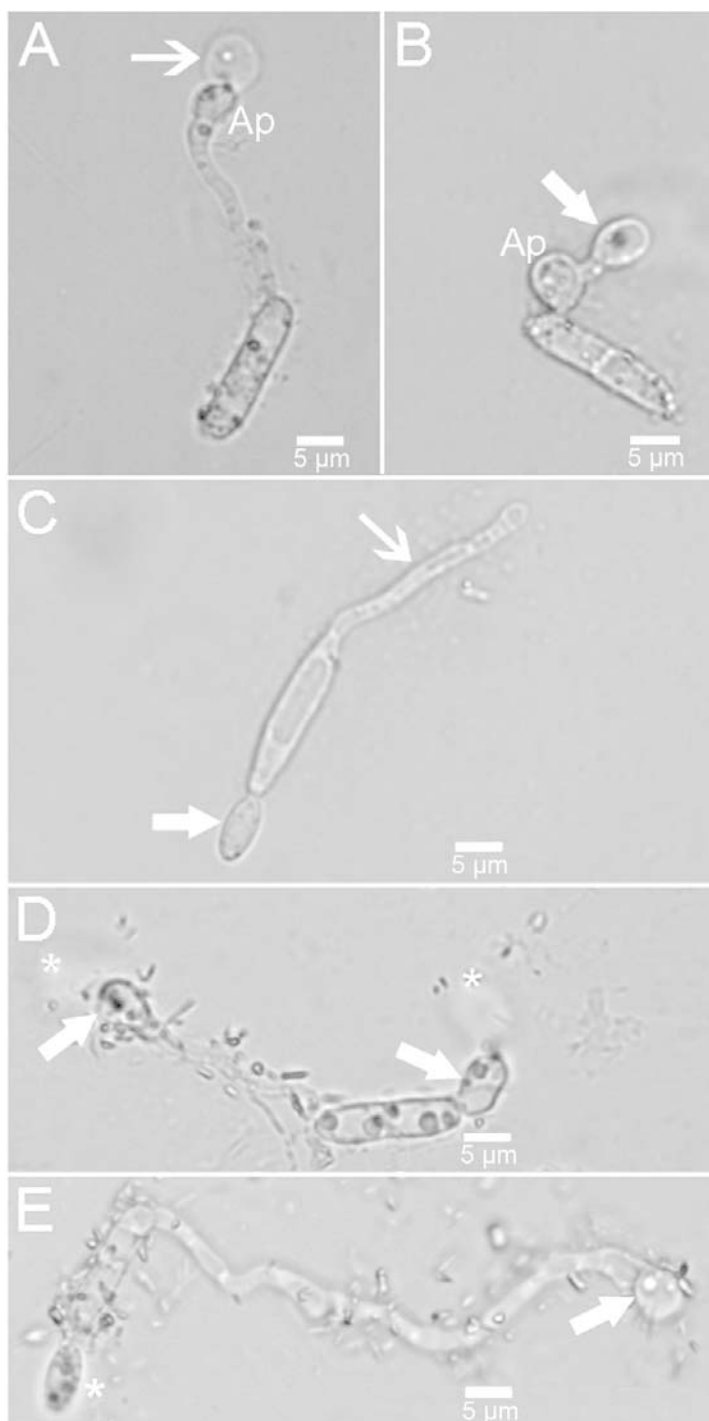
Conídios incubados com 10 µg/mL de carpropamida por 48 horas. Coluna da esquerda: Análises de DIC. Coluna da direita: Coloração com VN em microscópio confocal. A – Observa-se um conídio germinado com um apressório não melanizado (Ap). B – Grandes corpos lipídicos são verificados no conídio germinado (seta grossa) e apressório (seta fina). C – Observa-se o plano de foco da hifa primária dentro do celofane (seta). D – A hifa primária também apresenta corpos lipídicos (seta).

5.1.4 Padrões de Germinação na Presença de Carpropamida

Como ilustrado na figura 7, diferentes padrões de germinação foram observados nos tratamentos com carpropamida. Foram encontrados apressório hialino com hifa primária (fig. 7A); apressório primário e apressório secundário a partir do primeiro (fig. 7B); tubo germinativo e conídio secundário (fig. 7C); dois apressórios, um em cada extremidade da célula (fig. 7D), podendo ou não apresentar hifa primária. Alguns ainda possuíam apressório em uma extremidade e conídio secundário na outra (fig. 7E). Além destes, padrões menos freqüentes como tubo germinativo e conídio secundário em uma extremidade e apressório na outra também foram observados (resultados não mostrados). A análise quantitativa dos diferentes padrões de germinação será descrita a seguir (ver item 5.1.5).

Na figura 7, observa-se também o acúmulo dos cristais de carpropamida. Este composto é bastante insolúvel, sendo liberado lentamente na solução. Esta característica é vantajosa para a sua aplicação em campos irrigados de arroz, permitindo uma ação prolongada. No entanto, nas análises microscópicas os cristais causaram dificuldades no sentido de encontrar campos mais limpos para captura de imagens. Contudo, os cristais acumulados não interferiram na visualização das estruturas em microscopia de luz, DIC, confocal e de fluorescência.

FIGURA 7 - PADRÕES DE GERMINAÇÃO NA PRESENÇA DE CARPROPAMIDA



Análises em microscopia de luz de conídios germinados com 48 horas de incubação sobre membrana de celofane. A-B: Concentração de 0,1 µg/mL de carpropamida. A – Observa-se um conídio germinado com apressório hialino (Ap) e hifa primária (seta). B – Observa-se um conídio germinado com apressórios primário (Ap) e secundário (seta) hialinos. C – Concentração de 1 µg/mL de carpropamida. Apresenta um conídio germinado com tubo germinativo (seta fina) e conídio secundário (seta grossa). D – Concentração de 10 µg/mL. Conídio germinado com dois apressórios hialinos (setas) e hifas primárias (asteriscos) fora do plano de foco. E – Concentração de 100 µg/mL de carpropamida. Conídio germinado com apressório hialino (seta) e conídio secundário (asterisco). Observa-se uma grande quantidade de cristais de carpropamida nas duas maiores concentrações.

5.1.5 Estudo Estatístico do Perfil de Germinação e Penetração na Presença do Inibidor de Síntese de Melanina

Considerando que ensaios preliminares demonstraram a penetração em membranas de celofane por apressórios hialinos (ver item 5.1.1), o que contradiz dados da literatura, realizou-se uma análise detalhada do perfil de germinação em diferentes concentrações do inibidor de melanização. Nas tabelas 1 e 2 e no apêndice (gráficos 1 e 2) estão os resultados de germinações com 24 e 48 horas de incubação. O gráfico 1 compara os resultados obtidos nos dois períodos de incubação.

Segue-se abaixo uma descrição dos resultados enfatizados nesta dissertação. No apêndice 1 encontra-se uma descrição detalhada de todos os aspectos observados.

5.1.5.1 Porcentagem de germinação

Não houve diferença significativa no número de conídios não germinados no controle e nas quatro concentrações de carpropamida testadas quando considerado o mesmo período de incubação, 24 (tabela 1) e 48 horas (tabela 2). Contudo, ocorreu um significativo aumento da germinação com o passar do tempo, tanto nos tratamentos com carpropamida quanto nos controles (gráfico 1A). A média de conídios não germinados foi significativamente maior com 24 horas de incubação que após 48 horas. Esses resultados indicaram que a carpropamida não afetou a capacidade de germinação dos conídios.

5.1.5.2 Melanização e penetração

A inibição da melanização do apressório pela carpropamida foi observada em todas as concentrações testadas (0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL), e frequência de apressórios não melanizados foi claramente maior nos tratamentos que no controle nos dois períodos de incubação (tabelas 1 e 2). A média de hifas primárias, no entanto, foi a mesma no controle e tratamentos com 24 horas de incubação (tabela 1). Com 48 horas, foi observada uma diferença significativa entre

a média de hifas primárias do controle e tratamentos, ocorrendo um aumento nos últimos (tabela 2). Além disso, o número de apressórios não melanizados aumentou significativamente comparando 24 e 48 horas de incubação (gráfico 1B). A ocorrência de hifas primárias dentro do celofane foi significativamente maior após 48 horas de incubação do que com apenas 24 horas (gráfico 1C).

Apressórios melanizados foram observados apenas nas células do controle e a sua quantidade dobrou quando analisados em 24 (tabela 1) e após 48 horas (tabela 2) de incubação (gráfico 1D). A ocorrência de penetração a partir destes apressórios também mostrou um aumento significativo no maior tempo de incubação (gráfico 1E). Embora mais freqüentes nos tratamentos, apressórios hialinos também foram encontrados no controle (tabelas 1 e 2). Estes apressórios formaram hifas primárias no interior do celofane (tabelas 1 e 2), e a ocorrência destas foi significativamente maior após 48 horas de incubação (gráfico 1C).

5.1.5.3 Tubos germinativos

No período de 24 horas de incubação (tabela 1), ocorreu um significativo aumento de tubos germinativos nas duas maiores concentrações de carpropamida testadas (10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$) em relação ao controle. Na germinação com 48 horas de incubação (tabela 2), observamos um aumento significativo de tubos germinativos nas concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ quando comparados com o controle. Contudo, na comparação das médias de tubos germinativos nos dois períodos de incubação não foi encontrada diferença significativa (gráfico 1F).

5.1.5.4 Conídios secundários

Com 24 horas de incubação a quantidade de conídios secundários diferiu do controle nas três maiores concentrações (1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$), nas quais ocorreu um aumento significativo. Esse aumento chegou a cerca de 4 vezes no tratamento com 100 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 1). Entretanto, após 48 horas de incubação a quantidade de conídios secundários encontrada no controle foi semelhante,

estatisticamente, à encontrada nos tratamentos (tabela 2). Comparando os dois períodos de incubação, a ocorrência de conídios secundários foi significativamente maior em 48 horas do que em 24 horas no controle e nas concentrações 0,1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL (gráfico 1G).

5.1.5.5 Apressórios secundários

A diferença de apressórios secundários com relação ao controle não seguiu um padrão dependente da concentração do tratamento nos dois tempos testados. Em 24 horas de incubação ela foi significativa apenas nas concentrações 1 µg/mL e 100 µg/mL de carpropamida (tabela 1), enquanto que em 48 horas de diferiu significativamente do controle apenas nos tratamentos com 1 µg/mL e 10 µg/mL (tabela 2).

TABELA 1 - PERFIL DE GERMINAÇÃO EM 24 HORAS DE INCUBAÇÃO COM INIBIDOR DE MELANIZAÇÃO

	Controle	Tratamento com carpropamida (µg/mL) - 24h				Prob > F
		0,1	1	10	100	
Conídio germinado	39,2 ± 6,6	26,6 ± 3,7	35,3 ± 3,5	29,7 ± 3,5	31,2 ± 4,5	0,3236
Apressório não melanizado	9,6 ± 1,7	61,8* ± 6,2	52,3* ± 3,6	36,6* ± 5	35,3* ± 3	<.0001
Hifa primária de Ap não M ^a	2,9 ± 1	3,6 ± 1,1	1,9 ± 0,6	1,5 ± 0,8	1,3 ± 0,7	0,296
Apressório melanizado	41,8 ± 5,4	0* ± 0	0* ± 0	0* ± 0	0* ± 0	<.0001
Hifa primária de Ap M ^b	12,7 ± 4,1	0* ± 0	0* ± 0	0* ± 0	0* ± 0	<.0001
Tubo germinativo	17 ± 3,3	16,9 ± 3,4	27,6 ± 5,1	49,2* ± 5,1	46,3* ± 5,7	<.0001
Conídio secundário	5,4 ± 1,1	19,2 ± 5,4	38,7* ± 5,3	24,2* ± 4,8	23,7* ± 4	<.0001
Apressório secundário	0,3 ± 0,2	2,7 ± 0,8	3,8* ± 0,9	1,8 ± 0,6	5,6* ± 1,3	0,0005

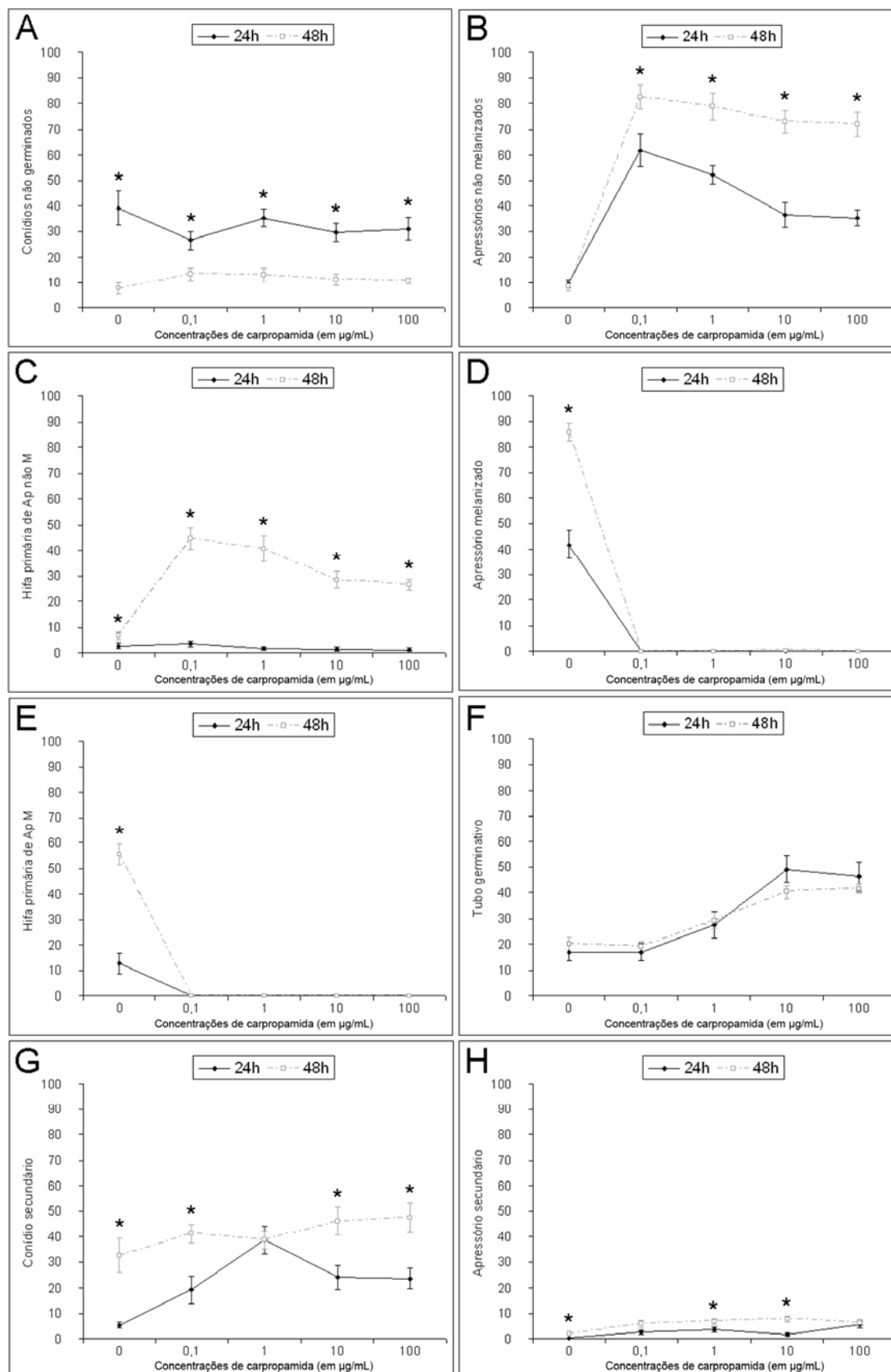
NOTA: Estão representados os padrões de germinação nas diferentes concentrações de tratamento com carpropamida (µg/mL). Os valores indicam a média ± erro padrão da média e foram comparados através do teste ANOVA. Valores significativamente diferentes do controle (*) foram definidos usando o pós-teste de Dunnett; α=0,05. ^a = apressório (Ap) não melanizado (M); ^b = apressório (Ap) melanizado (M).

TABELA 2 - PERFIL DE GERMINAÇÃO EM 48 HORAS DE INCUBAÇÃO COM INIBIDOR DE MELANIZAÇÃO

	Controle	Tratamento com carpropamida ($\mu\text{g/mL}$) - 48h				Prob > F
		0,1	1	10	100	
Conídio germinado	7,7 \pm 2,3	13,3 \pm 2,6	13,1 \pm 2,8	11,1 \pm 2,2	10,8 \pm 1,1	0,4188
Apressório não melanizado	8,6 \pm 1,9	82,6* \pm 4,5	78,9* \pm 5,3	72,9* \pm 4,4	71,9* \pm 4,7	<.0001
Hifa primária de Ap não M ^a	6,9 \pm 1,5	44,6* \pm 4,3	40,6* \pm 4,9	28,4* \pm 3,3	26,4* \pm 2,3	<.0001
Apressório melanizado	85,7 \pm 3,7	0,0* \pm 0	0,1* \pm 0,1	0,2* \pm 0,1	0,0* \pm 0	<.0001
Hifa primária de Ap M ^b	55,4 \pm 4	0,0* \pm 0	0,1* \pm 0,1	0,1* \pm 0,1	0,0* \pm 0	<.0001
Tubo germinativo	19,9 \pm 2,9	19,1 \pm 1,9	29,3* \pm 3,1	40,3* \pm 2,6	41,7* \pm 1,8	<.0001
Conídio secundário	32,8 \pm 6,8	41,2 \pm 3,5	38,8 \pm 3,4	46 \pm 5,4	47,5 \pm 5,6	0,2673
Apressório secundário	2,2 \pm 0,5	5,8 \pm 1,3	6,8* \pm 1,4	7,7* \pm 1,3	6,3 \pm 1,2	0,0177

NOTA: Estão representados os padrões de germinação nas diferentes concentrações de tratamento com carpropamida ($\mu\text{g/mL}$). Os valores indicam a média \pm erro padrão da média e foram comparados através do teste ANOVA. Valores significativamente diferentes do controle (*) foram definidos usando o pós-teste de Dunnett; $\alpha=0,05$. ^a = apressório (Ap) não melanizado (M); ^b = apressório (Ap) melanizado (M).

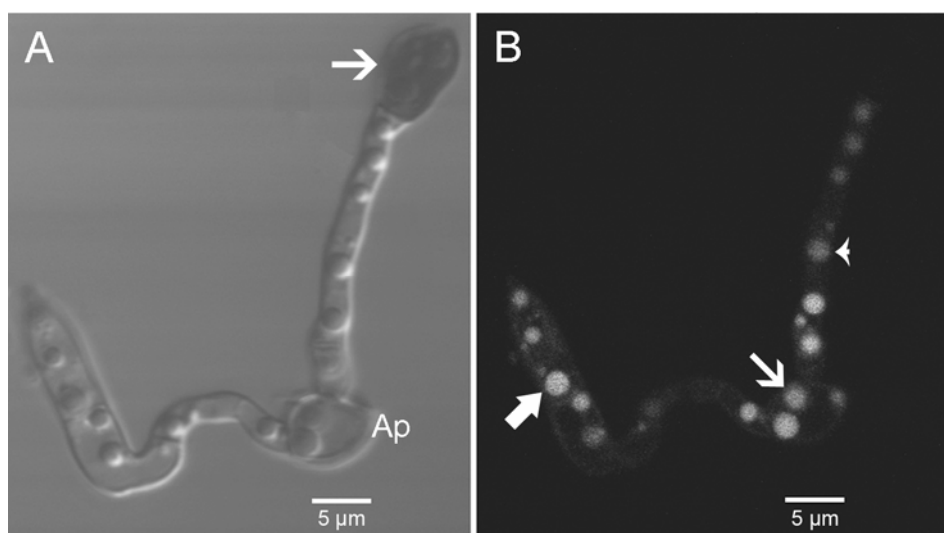
GRÁFICO 1 - EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA GERMINAÇÃO COM INIBIDOR DE MELANIZAÇÃO



5.1.6 Quantificação de Lipídeos em Conídios Germinados Tratados com Carpropamida e Sacarose

Como as análises visuais preliminares indicaram que a concentração de corpos lipídicos nos conídios germinados tratados com carpropamida era maior que no controle (figs. 4, 5 e 6), foi então realizado um estudo quantitativo da área de lipídeos para confirmar estes resultados. Dois controles foram realizados: a) conídios germinados somente com água e b) germinados na presença de sacarose como fonte de carbono (fig. 8).

FIGURA 8 - GERMINAÇÃO NA PRESENÇA DE 0,1% DE SACAROSE



A – Imagem de DIC de conídio germinado sobre lamínula de vidro com apressório primário não melanizado (Ap), e apressório secundário melanizado (seta). B – Coloração com VN do mesmo conídio germinado onde são observados grandes corpos lipídicos no conídio germinado (seta grossa), no apressório primário (seta fina) e no tubo germinativo (ponta de seta).

As análises estatísticas revelaram que existe diferença significativa entre a área total de corpos lipídicos do controle (incubado na presença apenas de água) e as áreas encontradas no controle com sacarose e no tratamento com carpropamida (tabela 3). Tanto os conídios germinados na presença de sacarose quanto os germinados com carpropamida apresentaram maior conteúdo lipídico que o controle.

TABELA 3 - CONTEÚDO LIPÍDICO DOS CONÍDIOS GERMINADOS

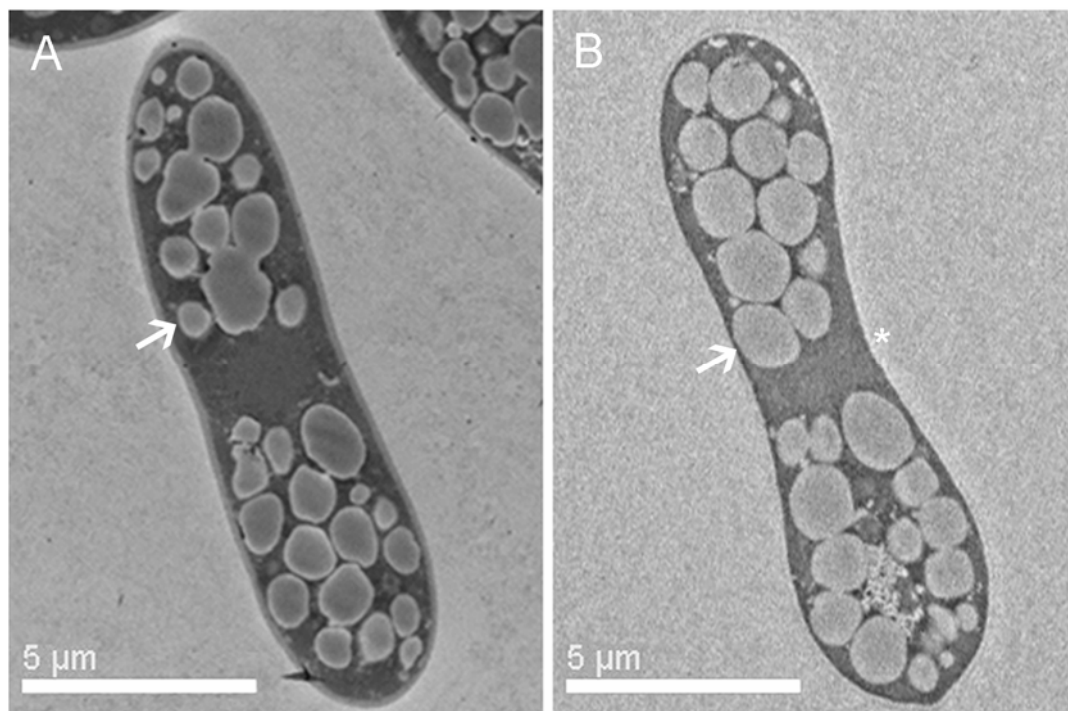
	Tratamentos			Prob > F
	Controle	Sacarose	Carpropamida	
Área de Lipídeos	4,5 ± 0,5	12,3* ± 0,9	10,9* ± 0,7	<.0001

NOTA: Está representada a área total de lipídeos (em micrômetros) dos conídios germinados do controle e dos tratamentos. A concentração de sacarose utilizada foi 0,1% e a de carpropamida 1 µg/mL. Os valores indicam a média ± erro padrão da média e foram comparados através do teste ANOVA. Valores significativamente diferentes do controle (*) foram definidos usando o pós-teste de Dunnett; $\alpha=0,05$.

5.1.7 Corpos Lipídicos dos Conídios não Germinados

Além de interferir na mobilização de lipídeos durante a germinação, a carpropamida mostrou efeito sobre os conídios que não germinavam, como já observado anteriormente em nosso laboratório (BARBOSA, 2005). Na comparação das imagens ultraestruturais de cortes longitudinais de conídios não germinados do controle (fig. 9A) e tratados com carpropamida (fig. 9B) observou-se que os conídios tratados adquiriram formato anormal, com aumento do volume celular, com exceção da região central onde se localiza o núcleo, produzindo um acinturamento da célula. O acúmulo e o aumento de tamanho dos corpos lipídicos, assim como o mesmo padrão de acinturamento ficou facilmente evidente através de cortes ópticos (filme 1).

FIGURA 9 - ULTRAESTRUTURA DE CONÍDIOS NÃO GERMINADOS NA INCUBAÇÃO COM CARPROPAMIDA



MET de conídios não germinados. A – Conídio não germinado do controle, repleto de corpos lipídicos (seta). B – Conídio não germinado em presença de 40 µg/mL de carpropamida. Nota-se o acinturamento celular (asterisco) e os corpos lipídicos (seta).

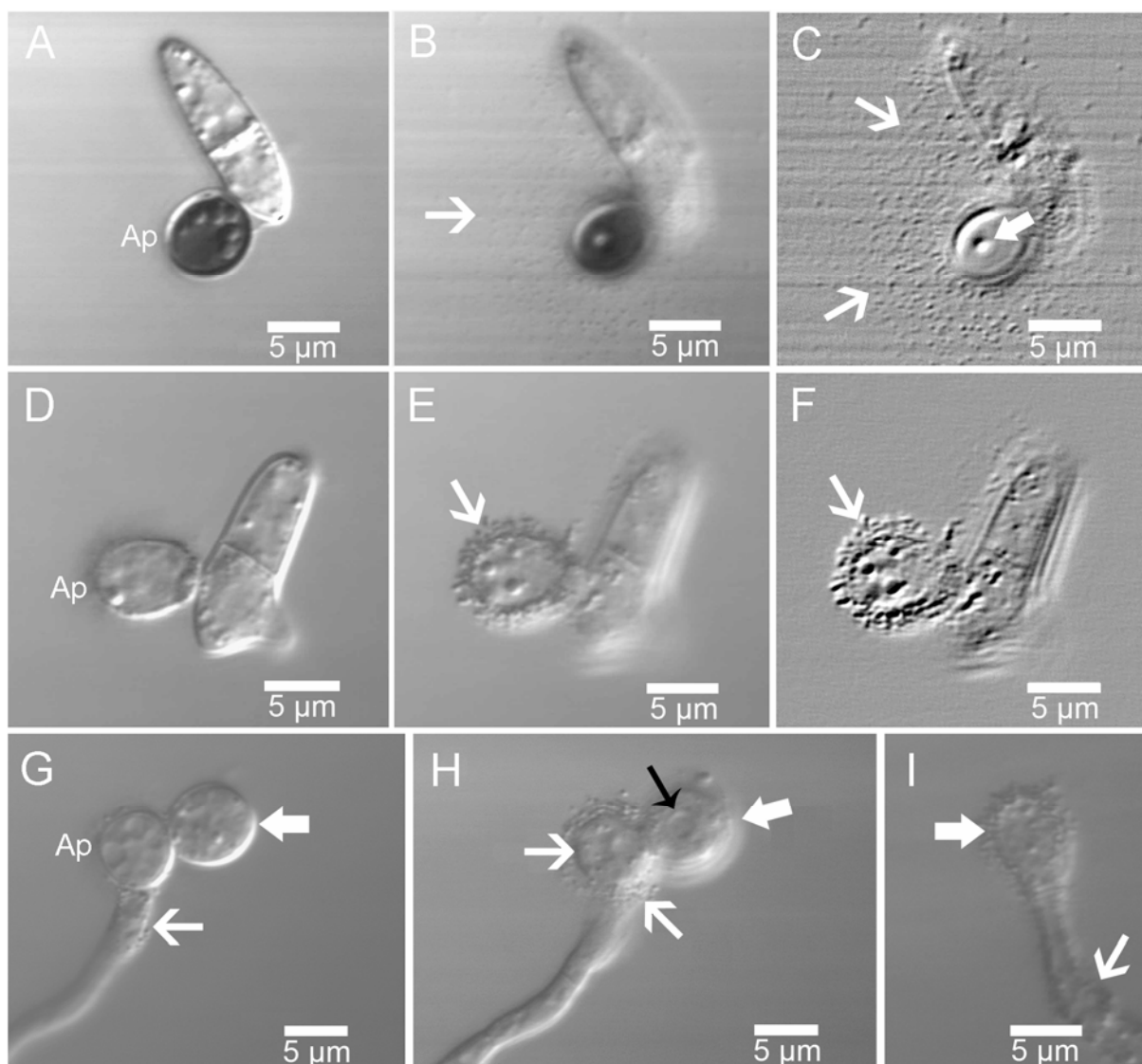
5.1.8 Matriz Extracelular Durante a Germinação

A matriz extracelular nos apressórios do controle e do tratamento com carpropamida foi facilmente observada através de DIC (fig. 10), sem a adição de qualquer marcação. Em microscopia de luz, a matriz geralmente mostrava uma coloração amarelada (resultados não mostrados). No controle, com 48 horas de incubação, a matriz extracelular estava freqüentemente distribuída de forma mais espalhada ao redor do conídio germinado e apressório (figs. 10A-C), enquanto que nos tratamentos com o inibidor de melanização (carpropamida) a mesma aparecia em muitas células concentrada ao redor do apressório, formando um halo bastante compacto (figs. 10D-F). Estes resultados sugerem distribuição diferenciada entre controle e tratamento que deverá ser futuramente investigada através de outros ensaios e análises estatísticas. Outro aspecto a ser ressaltado é a posição da matriz extracelular relativa ao apressório. Na maioria das células, quando a face superior

era focalizada não se observava material ao redor do apressório (figs. 10A e 10D), que passava a ser visível quando se focalizava a base do mesmo (figs. 10B e 10E). A matriz extracelular também foi verificada em tubos germinativos (figs. 10G-I) e apressórios primários (fig. 10H). Em alguns casos foi possível observar maior deposição de matriz extracelular nos apressórios primários, quando comparado com o secundário (fig. 10H). Estes resultados sugerem que a matriz extracelular é adicionada à medida que o apressório amadurece.

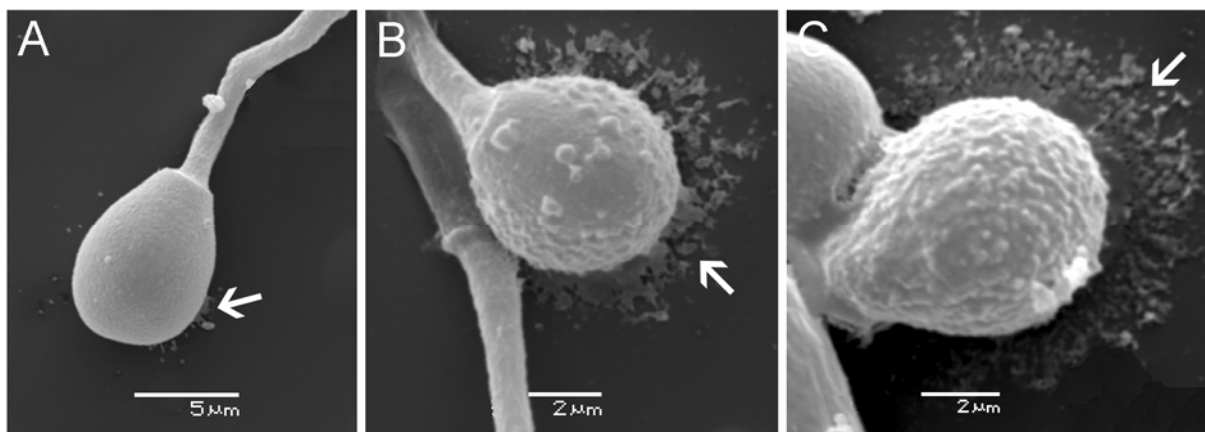
Resultados similares aos observados através de DIC foram observados através de MEV (figs. 11 e 12). Foi possível visualizar diferentes estágios de deposição de matriz nos apressórios do controle (fig. 11) e nos submetidos ao tratamento com o inibidor (fig. 12). Apressórios praticamente sem (figs. 11A e 12A), com pouca (figs. 11B e 12B) e muita (figs. 11C e 12C) matriz extracelular foram observados.

FIGURA 10 - MATRIZ EXTRACELULAR NO TRATAMENTO COM CARPROPAMIDA



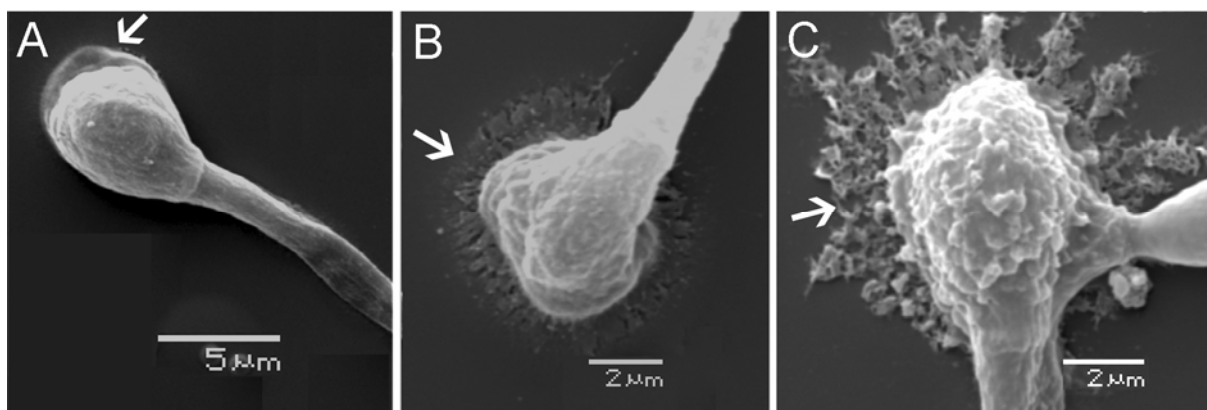
Germinação sobre lamínulas de vidro vista através de DIC após 48 horas de incubação. A-C: Controle. D-I: Tratamento com 1 µg/mL de carpropamida. A – Observa-se um conídio germinado com apressório melanizado (Ap), com foco na superfície do apressório. Não se observa matriz extracelular (ME) ao redor do apressório. B – O mesmo conídio é visto com foco na base do apressório. Observa-se a ME no apressório e estendendo-se em volta do conídio (seta). C – A imagem foi processada em programa Adobe Photoshop (filtro Emboss) para destacar a ME no apressório e estendendo-se em volta do conídio (setas finas) e o poro (seta grossa). D – Observa-se um conídio germinado com apressório hialino (Ap). Neste plano de foco não se observa ME ao redor. E – O mesmo conídio visto em plano de foco onde observa-se que a ME está concentrada ao redor do apressório (seta). F – A imagem D foi processada em programa Adobe Photoshop (filtro Emboss) para destacar a matriz (seta). G – Observa-se um apressório primário (Ap) e um apressório secundário (seta grossa) ambos hialinos. Pode-se verificar a ME ao redor do tubo germinativo (seta fina). H – Observa-se um plano de foco da face inferior dos apressórios vistos em G. A matriz extracelular ao redor do apressório primário (setas brancas finas) e o poro (seta preta) no apressório secundário (seta branca grossa) são observados. I – Observa-se um tubo germinativo (seta fina) e um apressório (seta grossa) cobertos por ME.

FIGURA 11 - GRAUS DE DEPOSIÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR EM APRESSÓRIOS DO CONTROLE



MEV de conídios germinados sobre lamínula de vidro com 24 horas de incubação. A – Apressório com início de formação de ME (seta). B – Apressório com maior deposição de matriz extracelular, espalhando-se sobre a lamínula (seta). C – Grande quantidade de matriz cobrindo o apressório e sobre a lamínula (seta).

FIGURA 12 - GRAUS DE DEPOSIÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR EM APRESSÓRIOS APÓS TRATAMENTO COM CARPROPAMIDA

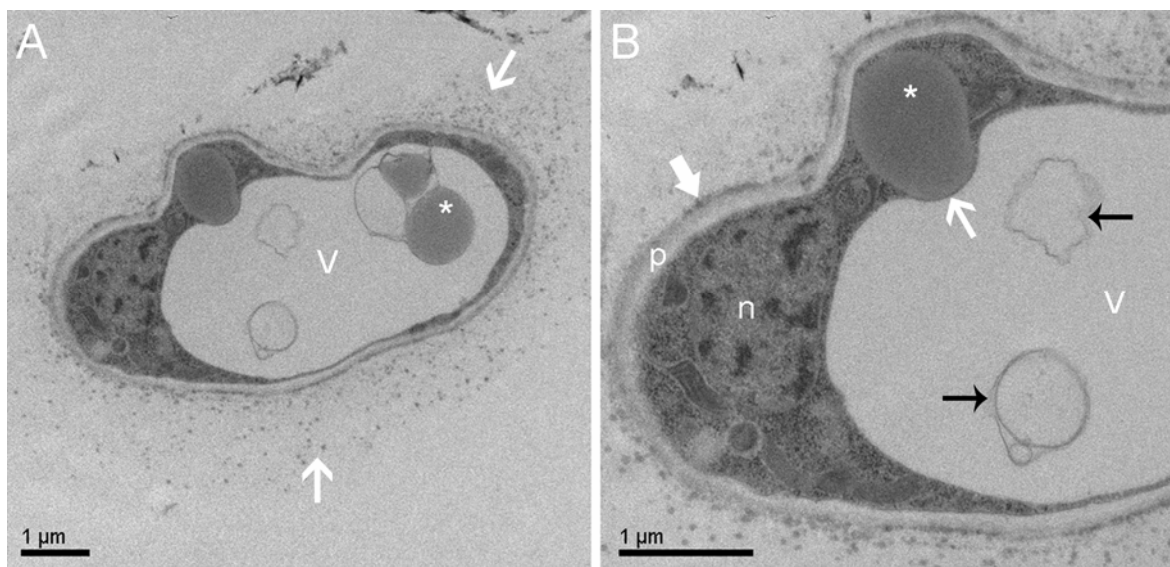


MEV de conídios germinados sobre lamínula de vidro na presença de carpropamida com 24 horas de incubação. A – Observa-se um apressório com início de formação de ME sobre a lamínula (seta). B – Apressório firmemente aderido à lamínula e ME sobre a lamínula (seta). C – Observa-se grande quantidade de ME cobrindo o apressório e sobre a lamínula (seta).

Nos cortes ultrafinos observou-se uma mistura de cortes de apressórios, tubos germinativos e eventualmente conídios germinados. Na identificação dos apressórios foram utilizados critérios baseados na microscopia de luz e eletrônica, como segue: a) Todas as células com diâmetro igual ou menor que o diâmetro de tubos germinativos (1-2,5 μm) foram desconsideradas; b) todas as células com parede celular de espessura igual ou menor a dos conídios (0,08-0,1 μm) e tubos germinativos (0,05-0,1 μm) também foram desconsideradas; c) células com as medidas maiores que as descritas nos itens (a) e (b) e com características marcantes como abundante matriz extracelular e parede celular espessa foram consideradas apressórios. Concordou-se aqui com as descrições de outros autores de que a parede celular dos apressórios é normalmente mais grossa que as paredes do esporo e do tubo germinativo (EMMETT; PARBERY, 1975). No futuro pretende-se desenvolver uma estratégia que permita identificar apressórios mais facilmente e com a mínima margem de erro.

Análises ultraestruturais de MET revelaram a presença de material com granulações e fibrilas mais eletrodensas, possivelmente matriz extracelular, ao redor de apressórios (fig. 13A-B). Esta célula provavelmente corresponde a um apressório não melanizado. Corpos lipídicos entrando por possível processo microautofágico (fig. 13B) e no interior do vacúolo (fig. 13A) foram observados. Além dos corpos lipídicos, vesículas foram frequentemente verificadas no interior dos vacúolos (fig. 13A). Estes resultados estão em concordância com a presença de vacúolos nos apressórios, conforme observado através de microscopia confocal (fig. 4G-H).

FIGURA 13 - MET DA MATRIZ EXTRACELULAR EM CÉLULAS DO CONTROLE



MET de apressórios de conídios com 24 horas de germinação na presença somente de água. A – Observa-se matriz extracelular ao redor do apressório (setas). Corpos lipídicos (asterisco) são observados no interior do vacúolo vacúolo (V). B – Detalhe da figura A mostrando o material eletrodense (seta grossa) ao redor da parede celular (p) e o núcleo (n). Nota-se um corpo lipídico (asterisco) em uma invaginação da membrana do vacúolo (seta fina) além de outras vesículas membranosas (setas pretas).

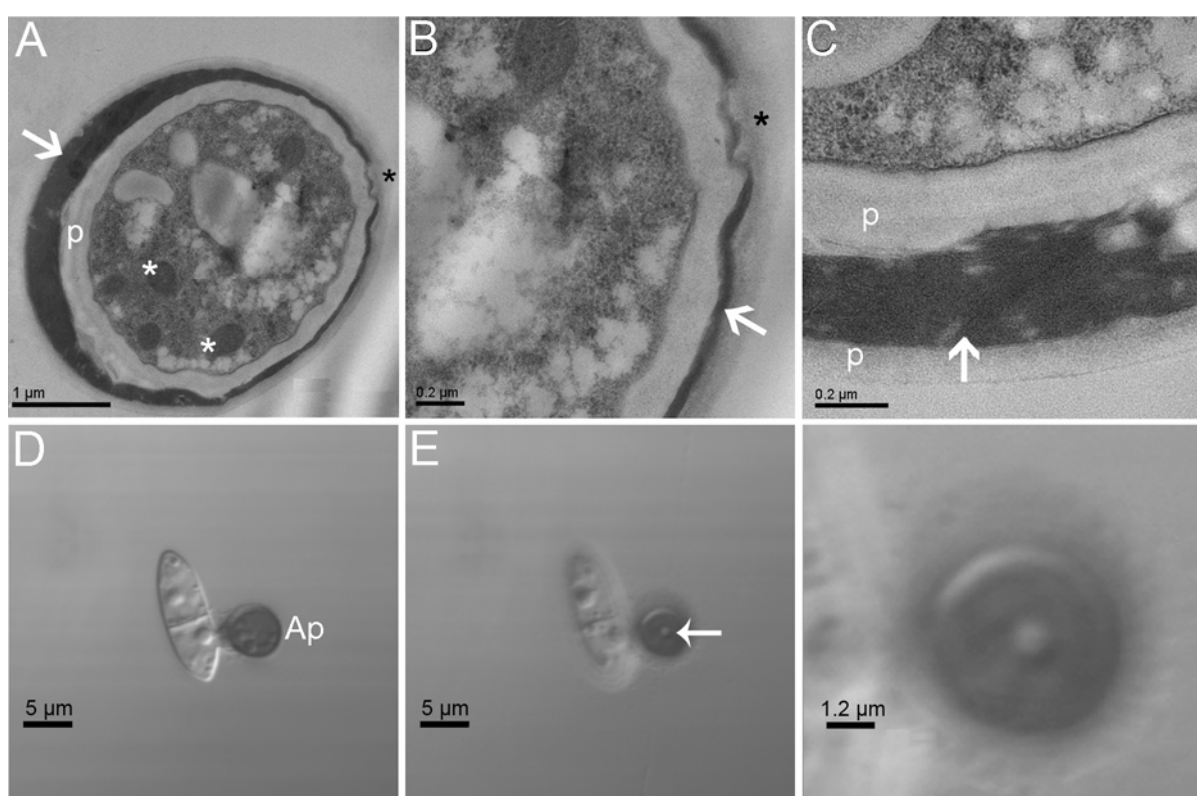
5.1.9 Aspectos Ultraestruturais de Apressórios

5.1.9.1 MET de células controle

As análises ultraestruturais do controle revelaram uma camada bastante eletrodensa nos apressórios, a qual parece corresponder à deposição de melanina na parede celular (fig. 14A-C). Esta camada está localizada entre outras duas camadas pouco eletrodensas (fig. 14C) e pode corresponder à linha espessa e escura observada através de DIC em apressórios completamente melanizados (fig. 2C). Os apressórios, quando analisados através de DIC e focalizados na face superior, apareciam homogeneamente muito escuros devido à melanina (fig. 14D). Mudando o plano de foco para a base celular, a região do poro era facilmente visualizada como uma depressão mais clara de formato circular (fig. 14E-F) que corresponde ao estreitamento da parede celular na região do poro (fig. 14A-B).

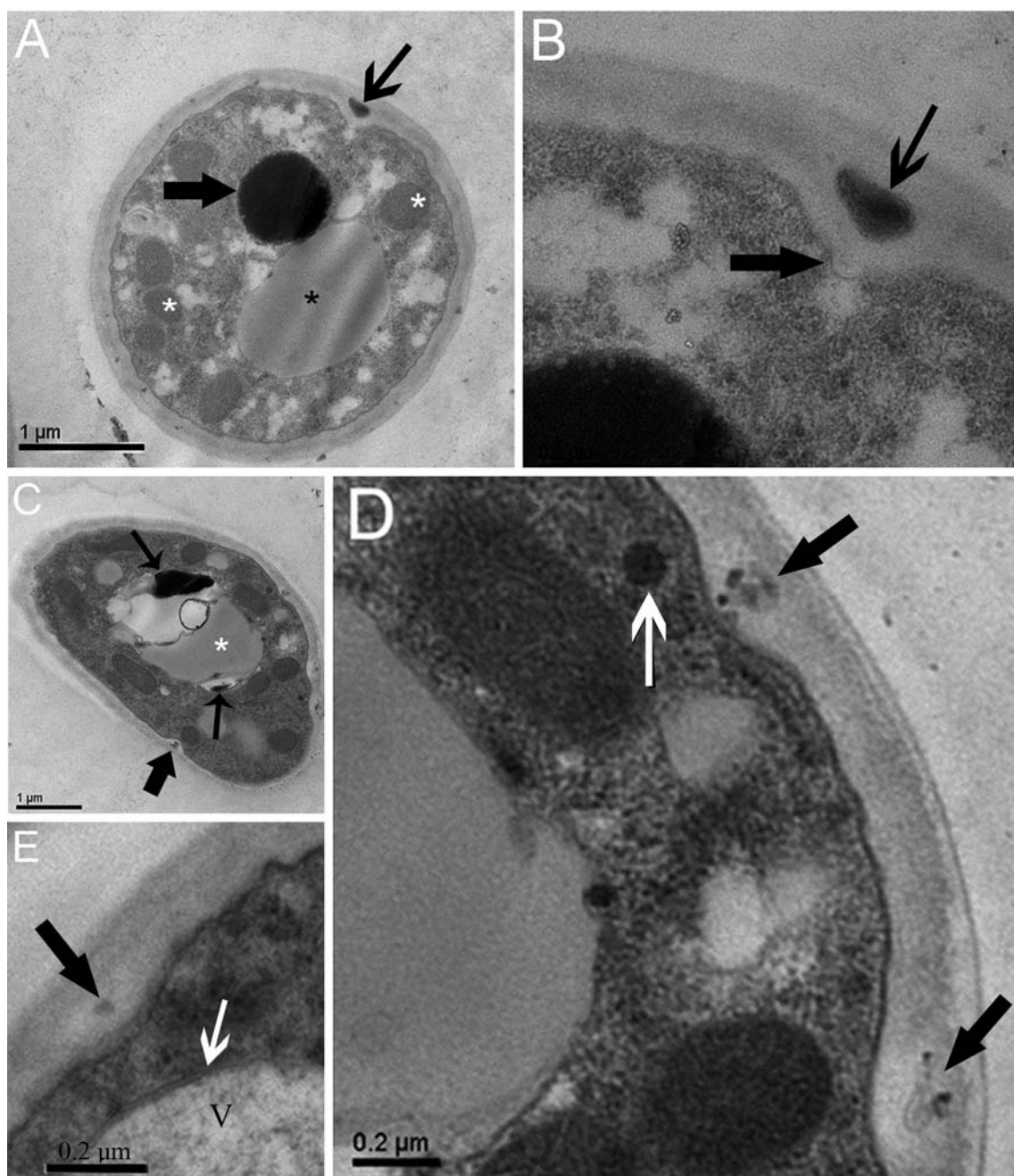
A parede celular sem a deposição da camada eletrodensa também foi observada nos apressórios do controle (fig. 15A-E). Estas células provavelmente correspondem aos apressórios ainda não totalmente melanizados. Os apressórios mostravam corpos lipídicos e granulações muito eletrodensas no citoplasma (fig. 15A-C).

FIGURA 14 - PAREDE CELULAR DO APRESSÓRIO MELANIZADO



A-C: Análises através de MET. D-E: Análises através de DIC. A – Observa-se um apressório com parede celular mostrando uma camada clara (p) e camada bastante eletrodensa (seta), exceto na região do poro (asterisco preto). Mitocôndrias também estão mostradas (asteriscos brancos). B – Detalhe da região poro do apressório (asterisco) evidenciando delgada camada eletrodensa (seta) na parede celular adjacente. C – Detalhe de uma parede celular (p) com a camada bastante eletrodensa (seta) situada no meio de duas camadas mais claras (p). D – Observa-se um conídio germinado com apressório melanizado (Ap). E – Plano de foco na base do apressório mostrando o poro do apressório (seta). F – Detalhe do poro na base o apressório apressório.

FIGURA 15 - MET DE APRESSÓRIOS DO CONTROLE



MET apressórios de conídios germinados por 24 horas. A – Observa-se um corpo lipídico (asterisco preto) e grânulo eletrodenso (seta grossa), mitocôndrias (asteriscos branco) e material eletrodenso na parede celular (seta fina). B – Detalhe da parede celular da célula anterior mostrando a invaginação da membrana celular (seta grossa) e um grânulo eletrodenso na parede celular (seta fina). C – Material lipídico (asterisco) e grânulos eletrodensos (setas finas) estão evidentes. Em vários pontos observam-se granulações eletrodensas na parede celular (seta grossa). D - Ampliação de região da imagem C, mostrando os grânulos eletrodensos na parede celular (setas grossas) próximos a invaginações da membrana. Observa-se grânulo eletrodenso intracelular (seta branca). E – Detalhe de um apressório com pequena granulação na parede (seta preta) próxima à invaginação da membrana. Observa-se também um detalhe da estrutura trilaminar (seta branca) da membrana do vacúolo (V).

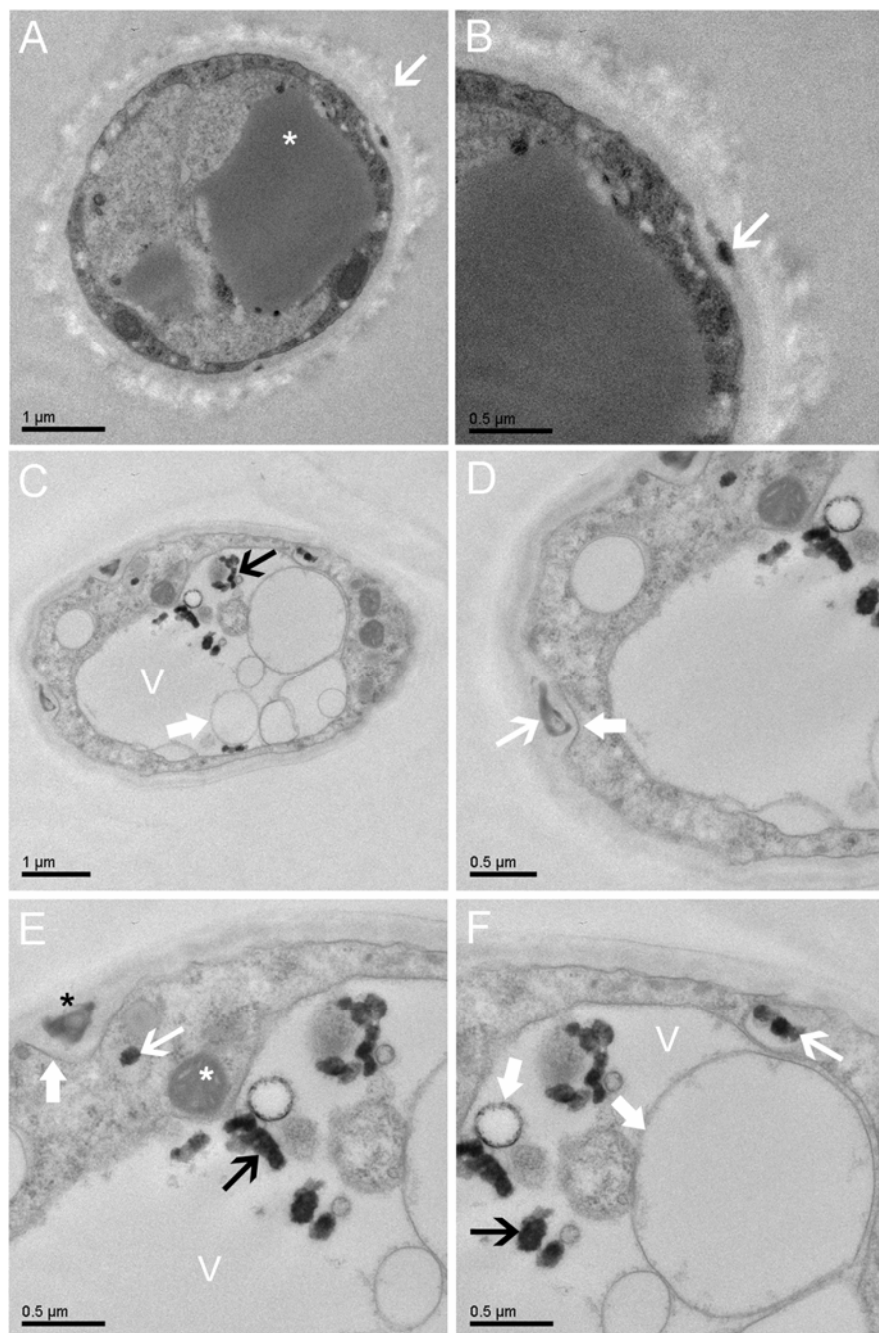
5.1.9.2 MET de apressórios hialinos

Nas análises ultraestruturais após tratamento com o inibidor da síntese de melanina a camada eletrodensa não foi encontrada na parede dos apressórios (fig. 16). Poucos apressórios, provavelmente os mais maduros, apresentaram parede celular espessa, com limites irregulares e muito eletroluscentes (figs. 16A-B). A maior parte dos apressórios encontrados mostrou parede celular mais delgada e com limites bem definidos, sem a espessa camada eletrodensa (figs. 16C-F). Chamou atenção que em ambas as situações (controle e tratado) foi verificada a deposição de material eletrodense em determinados pontos da parede celular (figs. 15A-D e 16A-E), independente do tipo de contrastação utilizada (somente em bloco ou em bloco e em corte).

5.1.9.3 Evidências de secreção celular

As análises através de MET sugerem uma possível secreção de material na parede celular, tanto no controle (fig. 15) quanto nas células com síntese de melanina inibida (fig. 16). Granulações eletrodensas foram frequentemente observadas na parede celular (figs. 15A-E e 16A-E) ocorrendo uma invaginação da membrana citoplasmática na região destas granulações (figs. 15A-E e 16E). Na figura 16, por exemplo, observa-se um material eletrodense dentro do vacúolo juntamente com outras vesículas membranosas (fig. 16C-F). Esse material eletrodense também é visto no citoplasma (fig. 16E), próximo à parede do apressório no interior de uma vesícula (fig. 16F) e efetivamente na parede celular (fig. 16E).

FIGURA 16 - MET DE APRESSÓRIOS APÓS TRATAMENTO COM CARPROPAMIDA



MET de apressórios de conídios tratados com carpropamida com 24 horas de incubação. A – Observa-se a parede celular espessa, com limites irregulares e eletroluscentes (seta) e grande corpo lipídico (asterisco). B – Detalhe da parede celular mostrando a presença de grânulo eletrodenso na parede (seta). C - Observa-se um grande vacúolo (V) contendo materiais eletrodensos (seta preta) e vesículas membranosas (seta branca). D-F: Detalhes de diferentes partes do apressório mostrado em C. D – Observa-se a deposição de granulação eletrodenso na parede celular (seta fina) e invaginação da parede nesta região (seta grossa). E – No citoplasma nota-se uma mitocôndria (asterisco branco) e um grânulo eletrodenso próximo à parede celular (seta branca fina). A parede apresenta grânulo eletrodenso (asterisco preto) e invaginação da membrana nesta região (seta branca grossa). O vacúolo (V) também contém grânulos eletrodensos (seta branca fina). F – Evidencia-se a presença de vesículas membranosas de diferentes tamanhos (seta grossa) dentro do vacúolo (V), além das granulações eletrodensas dentro (seta preta) e fora do vacúolo (seta branca fina).

5.2 CONIDIOGÊNESE EM *C. acutatum*

5.2.1 Caracterização Ultraestrutural do Micélio e Conidiação Macroscópica

As placas de cultura vistas macroscopicamente mostravam abundante massa alaranjada de conídios (fig. 17). Esses conídios ficam depositados na forma livre na superfície do micélio, mergulhados em uma mucilagem hidrossolúvel. Apesar das extensivas lavagens durante o processamento para MEV, que removeu a maioria dos conídios na superfície da cultura, alguns conídios livres, já completamente formados, foram encontrados entre as hifas do micélio (fig. 18A e 18F).

FIGURA 17 - PLACA DE CULTURA DE *C. acutatum*



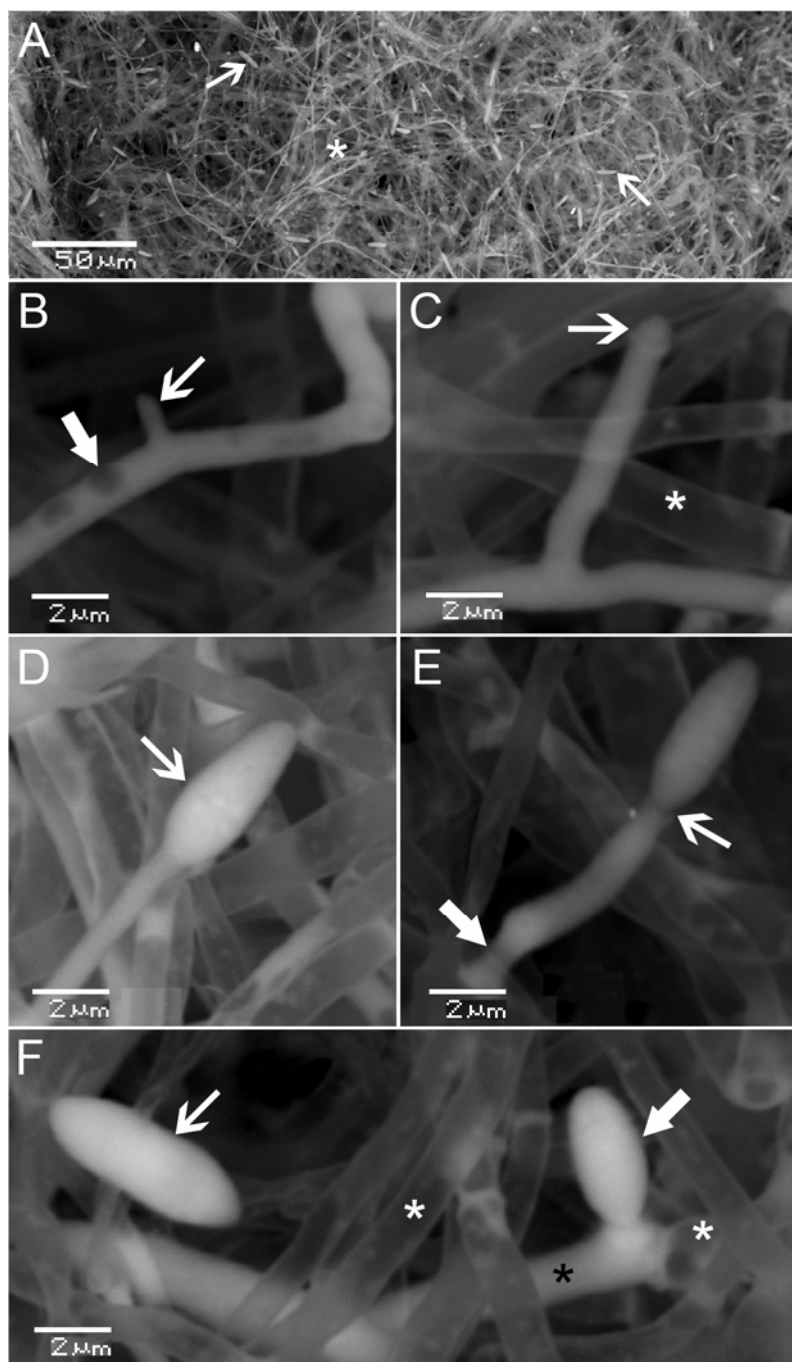
Ampliações maiores exibiram hifas do micélio vegetativo com extensas porções claras (fig. 18B e 18C). Estas regiões correspondem às porções celulares sem grandes vacúolos, como observado através de DIC (fig. 19B-C) e MET (fig. 20A-C). As regiões escuras (fig. 18B) e hifas muito transparentes (fig. 18C e 18F) correspondem aos vacúolos observados através de DIC (fig. 19B-D) e de MET (fig. 20B e 20C). As hifas pouco vacuolizadas observadas através de MEV (fig. 18B-C e

18F), DIC (fig. 19A-D) e MET (fig. 20A-B) estavam localizadas na superfície do micélio e relacionadas à conidiogênese.

Os conídios em desenvolvimento e os já formados se mostraram igualmente claros (fig. 18D-F) devido ao citoplasma repleto de estruturas celulares e ausência de grandes vesículas ou vacúolos. Observou-se que o conídio pode ser formado na extremidade da célula conidiogênica, a qual se desenvolveu a partir da hifa micelial ou somática (fig. 18D-E), ou pode se desenvolver lateralmente a uma hifa conidiogênica (figs. 18F e 19C-D). Estágios iniciais de formação (figs. 18D, 19B e 20C), até o completo desenvolvimento do conídio (figs. 18F e 19D) foram observados.

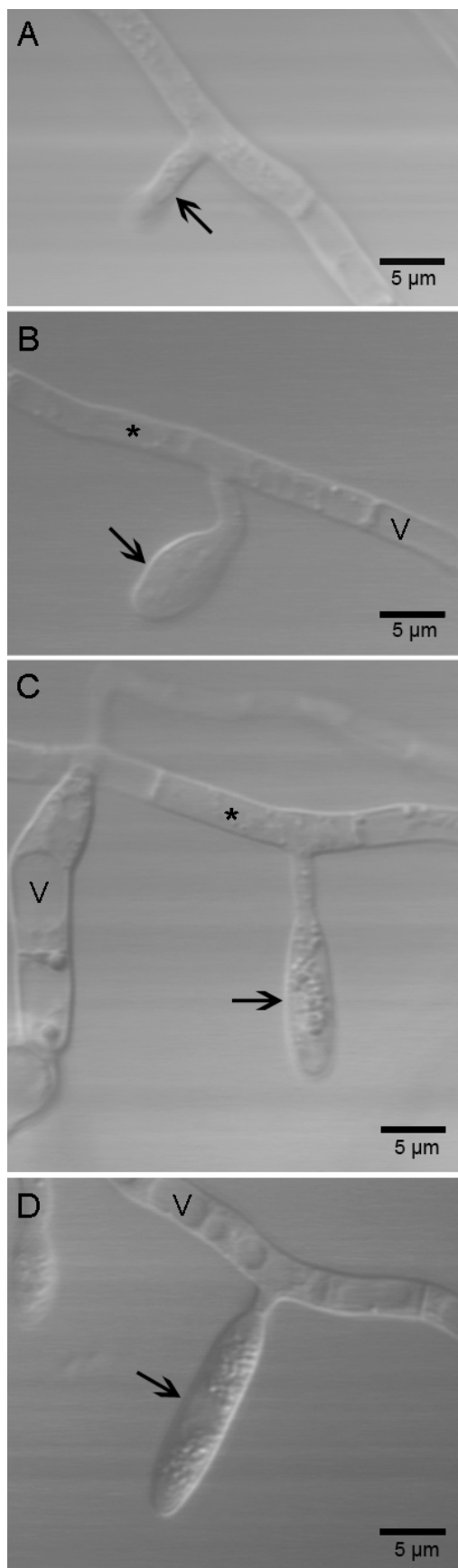
A ultraestrutura das células do fragmento de cultura demonstrou que as hifas podem penetrar profundamente dentro do meio BDA (fig. 20A). Nesta região, a maioria das células possuía grandes vacúolos (fig. 20B). Chamaram atenção as membranas no interior dos vacúolos das hifas (fig. 20B). As hifas na superfície das culturas, que estavam envolvidas na conidiogênese, mostraram um citoplasma bastante eletrodenso, com poucos vacúolos (figs. 18F, 20A e 20C). Esta grande eletrodensidade também foi observada no conídio em seus estágios iniciais de formação (figs. 18C-D e 20D). Após formados, os conídios jovens exibiam o citoplasma muito eletrodenso e repleto de corpos lipídicos (figs. 9A e 27A). Além disso, um material fibrilar, possivelmente mucilagem, foi encontrado ao redor da parede celular das hifas conidiogênicas e conídios em formação (fig. 20D).

FIGURA 18 - MEV EM BAIXO VÁCUO DA CULTURA DE BDA



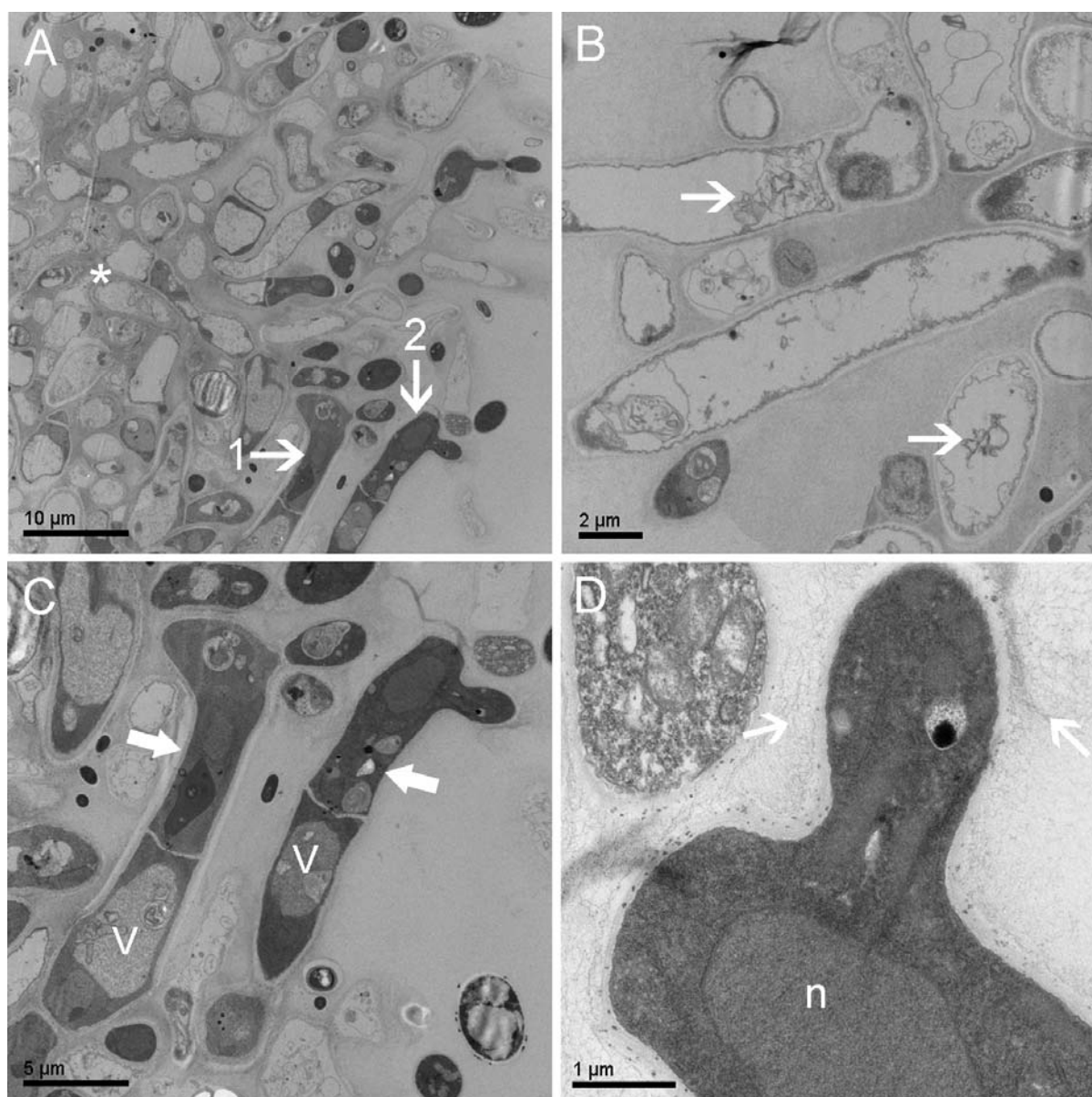
Conidiogênese observada através de MEV em baixo vácuo. Fragmento de cultura de três dias (descrição no item 4.8). A – Visão geral do micélio, com predomínio de hifas (asterisco) e alguns conídios (setas). B – Observa-se um estágio inicial da ramificação de uma hifa (seta fina) e regiões correspondentes a vacúolos (seta grossa). C – Mostra um estágio mais avançado da ramificação de uma hifa, com região correspondente ao vacúolo (asterisco). Observa-se uma dilatação na extremidade (seta). D – Estágio inicial do desenvolvimento de um conídio (seta). E – É possível ver o septo na base do conídio em formação (seta fina) e entre a hifa micelial e a célula conidiogênica (seta grossa). F – São vistas regiões transparentes correspondentes aos vacúolos (asteriscos brancos) e regiões claras correspondentes ao citoplasma da hifa (asterisco preto), um conídio livre (seta fina) e um conídio formado na porção lateral da hifa conidiogênica (seta grossa).

FIGURA 19 - ANÁLISE DA CONIDIOGÊNESE ATRAVÉS DE DIC



Conidiogênese observada através de DIC. Os conídios foram incubados por 24 horas em presença de meio Mc'coy para estimular o crescimento micelial de acordo com o item 4.3. Vários estágios de desenvolvimento dos conídios são mostrados (setas), além dos vacúolos (V) e a parte correspondente ao citoplasma (asterisco) das hifas. A – Ramificação inicial de uma hifa (seta). B – Início do desenvolvimento de um conídio (seta) a partir da lateral de uma hifa (asterisco). C – Estágio mais avançado da formação do conídio (seta). D – Conídio formado na porção lateral da hifa conidiogênica.

FIGURA 20 - MET DA CULTURA EM MEIO BDA

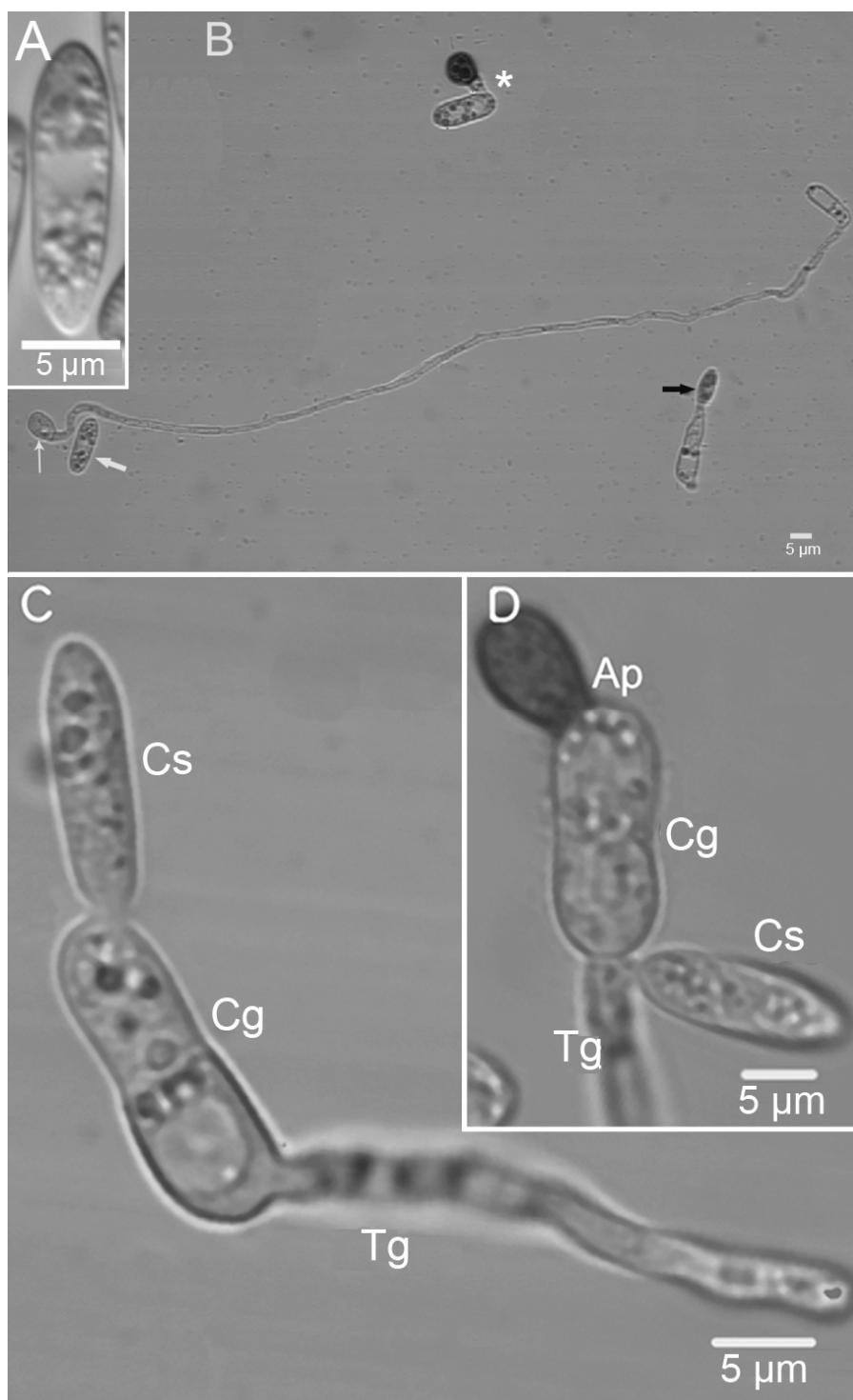


A – A região interna apresenta hifas vacuolizadas (asterisco) e na superfície do micélio são mostradas duas células conidiogênicas (1 e 2). B – Detalhe das hifas vacuolizadas e/ou degeneradas (setas) da região interna. C – As hifas conidiogênicas possuem citoplasma denso (setas) e vacúolos (V). D – Ampliação do conídio em formação na hifa 2 apontada em A. O núcleo (n) e um material fibrilar (setas) em torno da parede celular são observados.

5.2.2 Características Gerais da Germinação e Conidiação Microcíclica

A massa alaranjada depositada na superfície do micélio de *C. acutatum* (fig. 17) era formada por conídios livres, com formato elipsóide característico (fig. 21A e 21B), imersos em mucilagem e facilmente removidos com alça de platina. Estes conídios, ao germinarem, produziram diferentes padrões: tubos germinativos longos (fig. 21B) e curtos (fig. 21B) contínuos com o apressório; apressório sem conídio secundário (fig. 21B); tubo germinativo e conídio secundário sem apressório (fig. 21C); apressório em uma extremidade e tubo germinativo e conídio secundário em outra extremidade (fig. 21D); e apressório e tubo germinativo curto em uma extremidade e conídio secundário na extremidade oposta (fig. 22). Estes últimos padrões (a estrutura de infecção em uma extremidade e o conídio secundário na extremidade oposta) foram os modelos mais comuns de formação de conídio secundário. Os conídios secundários também se desenvolveram de conídios primários que não formavam tubo germinativo ou apressório (fig. 21B - seta preta).

FIGURA 21 - FORMAÇÃO DE CONÍDIOS SECUNDÁRIOS EM MICROSCOPIA DE LUZ



Diferentes conídios germinados vistos através de microscopia de luz. A – Conídio não germinado. B – Baixa ampliação mostrando um campo óptico com um conídio não germinado (seta branca grossa), germinação com tubo germinativo curto (asterisco) e longo com apressório (seta fina), e conídio secundário formado sozinho a partir de conídio primário (seta preta). C – Formação de tubo germinativo (Tg) e conídio secundário (Cs) a partir do conídio primário germinado (Cg). D – Conídio primário germinado (Cg) e conídio secundário (Cs) formado no mesmo lado do tubo germinativo (Tg) e apressório (Ap) melanizado.

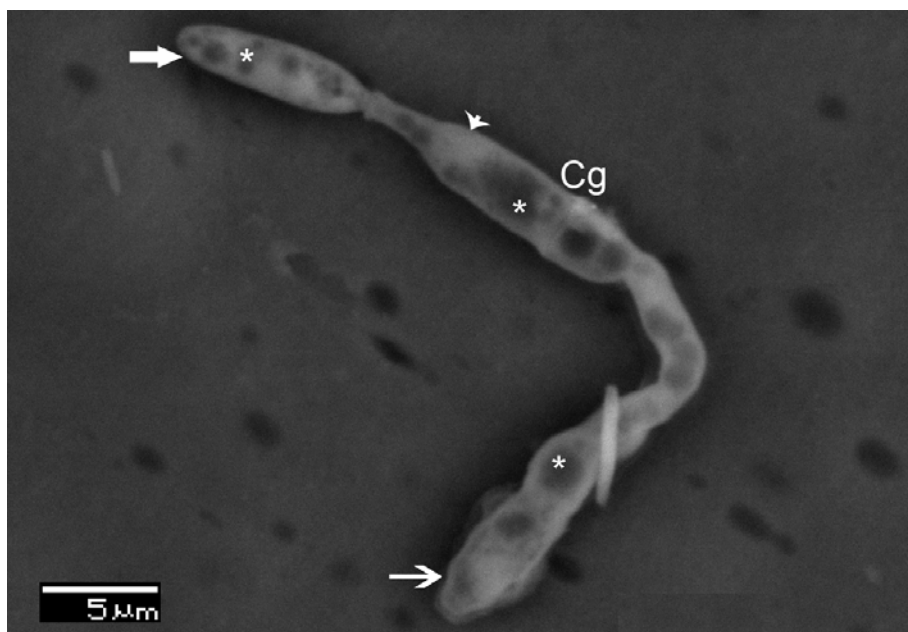
5.2.2.1 MEV de conídios secundários

O processamento para MEV em baixo vácuo e sem metalização mostrou-se adequado para uma análise geral, como pode ser observado na figura 22 e nas imagens da conidiogênese (ver item 5.2.1). Através desta metodologia, regiões celulares com maior conteúdo aparecem mais claras (fig. 22) enquanto as regiões correspondentes aos vacúolos aparecem mais escuras (fig. 22). Logo, além da morfologia de superfície, também foi possível visualizar as regiões de vacúolos nos conídios germinados, tubo germinativo e conídios secundários (fig. 22), conforme comparação com os resultados de microscopia confocal e DIC (ver item 5.2.2.3).

Já a MEV com metalização do material revelou detalhes da superfície (fig. 23) não observados através da MEV em baixo vácuo. Por outro lado, não revelou regiões mais claras e escuras correspondentes aos vacúolos e citoplasma mais organizado, conforme observado em MEV de baixo vácuo (fig. 22). Assim, as duas metodologias podem complementar as informações morfológicas obtidas com as demais análises microscópicas.

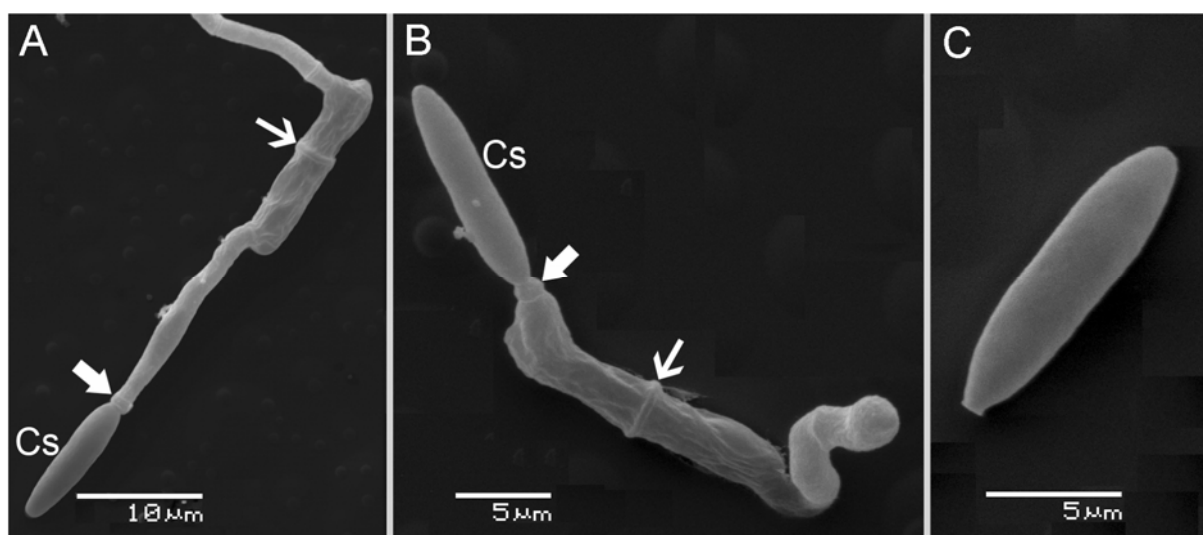
Através do MEV de alto vácuo foi possível observar o septo do conídio germinado (fig. 23A-B) e o septo entre o tubo germinativo e conídio secundário (fig. 23A), e entre o conídio e o conídio secundário se formando a partir deste (fig. 23B). A superfície do conídio secundário se mostrou bastante lisa (fig. 23C) e este não sofreu alteração com o processamento, como o murchamento observado no conídio germinado (fig. 23A-B). Provavelmente a intensa vacuolização observada durante a germinação (fig. 26B-C) modifica as propriedades osmóticas destas células e as mesmas perdem água frente às concentrações externas do fixador. Outra possibilidade é que essas células, devido aos grandes vacúolos, sejam mais facilmente alteradas durante a realização do ponto crítico tornando-se mais suscetíveis à perda de água.

FIGURA 22 - MEV DE BAIXO VÁCUO DE CONÍDIO GERMINADO



Observa-se um conídio germinado (Cg) com um conídio secundário (seta grossa) em uma extremidade e apressório (seta fina) se formando na extremidade oposta. Regiões mais claras (ponta de seta) e regiões mais escuras são observadas (asterisco).

FIGURA 23 - FORMAÇÃO DE CONÍDIOS SECUNDÁRIOS EM MEV



Conídios germinados analisados através de MEV de alto vácuo. A – Observa-se o septo (seta) do conídio germinado, e o septo (seta grossa) entre o tubo germinativo e o conídio secundário (Cs). B – Neste conídio nota-se o septo (seta) do conídio germinado e o septo (seta grossa) entre o conídio germinado e o conídio secundário (Cs). C – Um provável conídio secundário recentemente liberado.

5.2.2.2 Corpos lipídicos

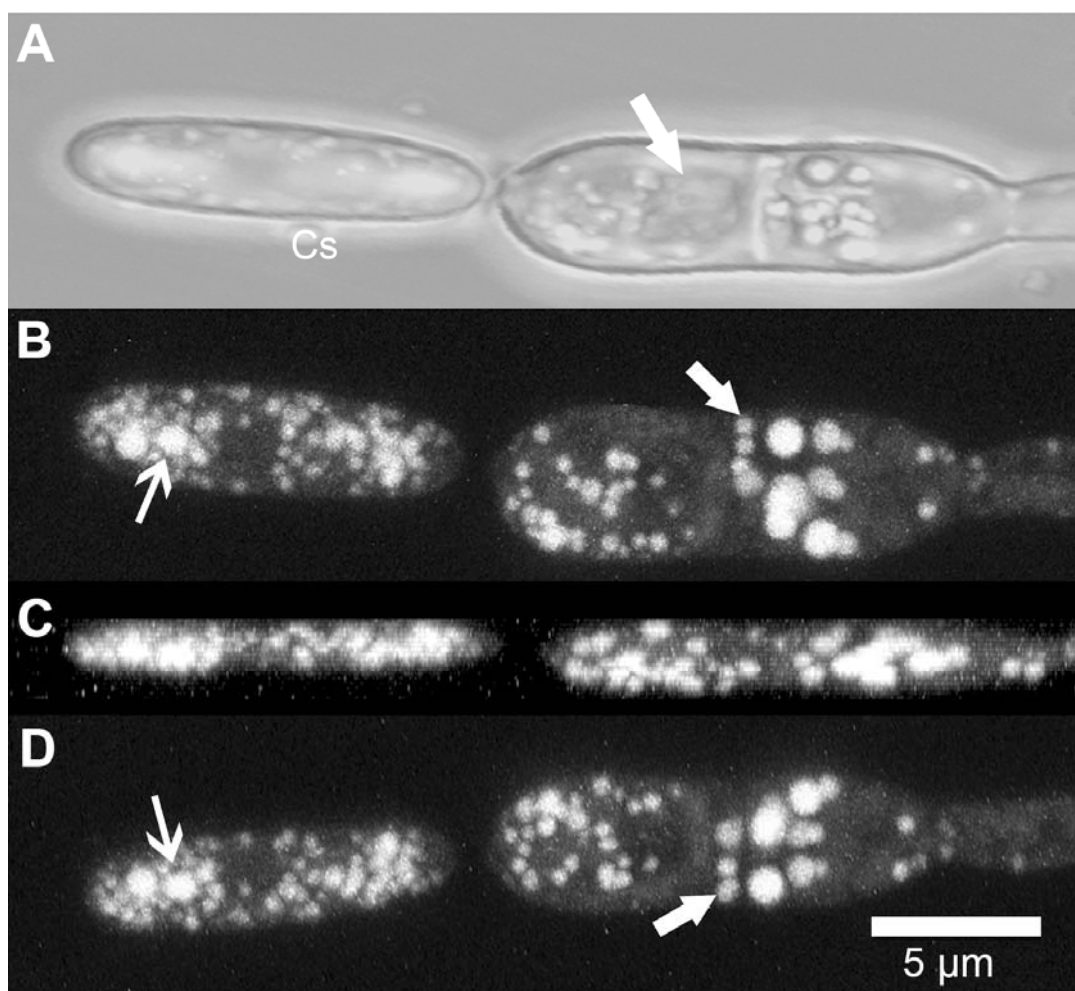
Os conídios não germinados de *C. acutatum* apresentaram o citoplasma repleto de corpos lipídicos (figs. 9 e 27A). Estas reservas diminuíram durante a germinação (ver item 5.1.2) e a formação dos conídios secundários (figs. 24B-D e 25B). Ao mesmo tempo em que os lipídeos escasseavam no conídio germinado, era possível ver o acúmulo de corpos lipídicos no conídio secundário em formação (figs. 24B-D; 25B; filmes 2 e 3). A distribuição dos corpos lipídicos encontrada nos conídios secundários (fig. 25B) se assemelhou à observada nos conídios não germinados (fig. 27A). A figura 24 mostra uma reconstrução tridimensional de um conídio germinado, na qual o conídio foi girado e podemos acompanhar a posição dos corpos lipídicos de diferentes ângulos, o que revela que os corpos lipídicos no conídio germinado e no conídio secundário se estendem por toda a célula.

5.2.2.3 Vacúolos e internalização dos corpos lipídicos durante a conidiação microcíclica

A vacuolização dos conídios ocorreu simultaneamente à formação de conídios secundários, como pôde ser observado na figura 25. Na coloração com vermelho Nilo estes vacúolos aparecem mais escuros que o citosol (fig. 25B - inserto). Corpos lipídicos próximos aos vacúolos e no interior dos vacúolos foram frequentemente vistos através de luz transmitida (fig. 25A) e por reconstrução tridimensional de séries z (fig. 25B).

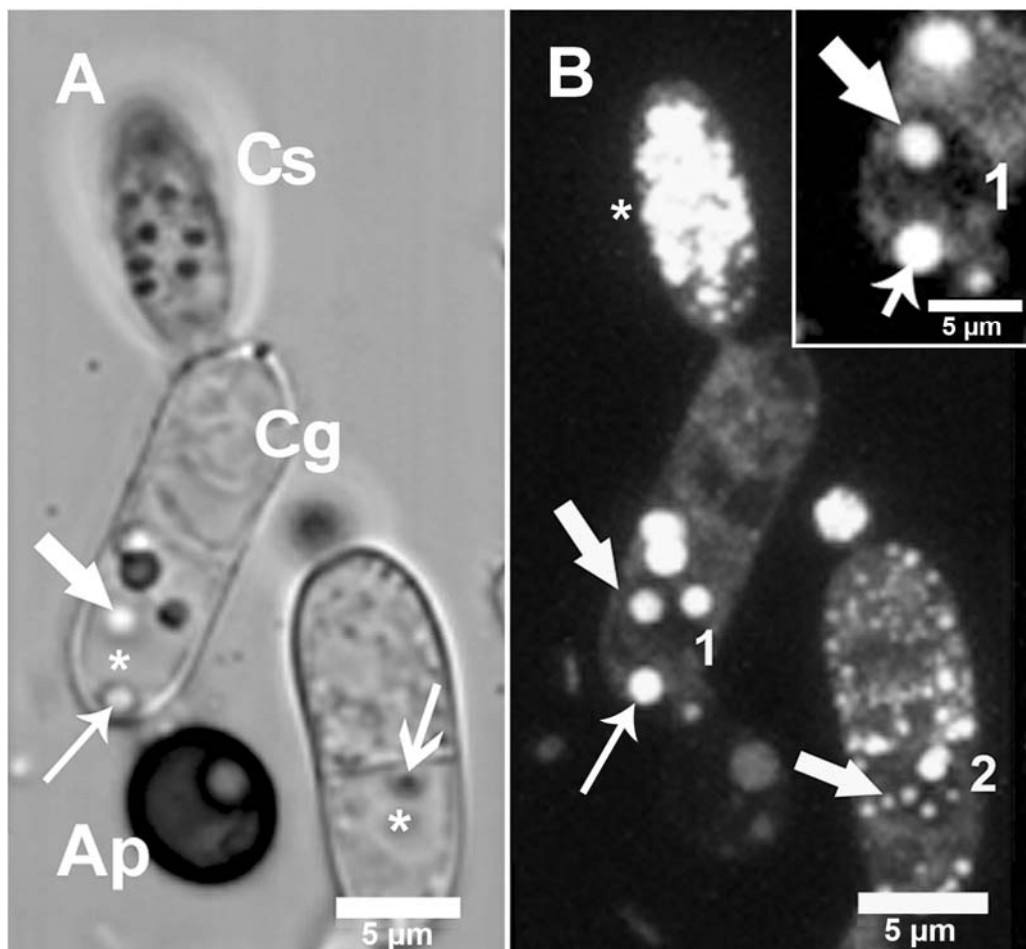
A marcação com laranja de acridina mostrou pequenos vacúolos dentro dos conídios não germinados (fig. 26A) e dos conídios secundários em vários estágios de desenvolvimento (fig. 26B-C). Intensa vacuolização foi observada nos conídios germinados, os quais passaram a apresentar grandes vacúolos (fig. 26B-C). Estes compartimentos exibiram pequenas vesículas intravacuolares mais fortemente marcadas que o lúmen vacuolar (fig. 26B-C). Contudo, vacúolos inteiramente marcados e sem vesículas intravacuolares também foram encontrados (resultados não mostrados).

FIGURA 24 - RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL DE CONÍDIO GERMINADO



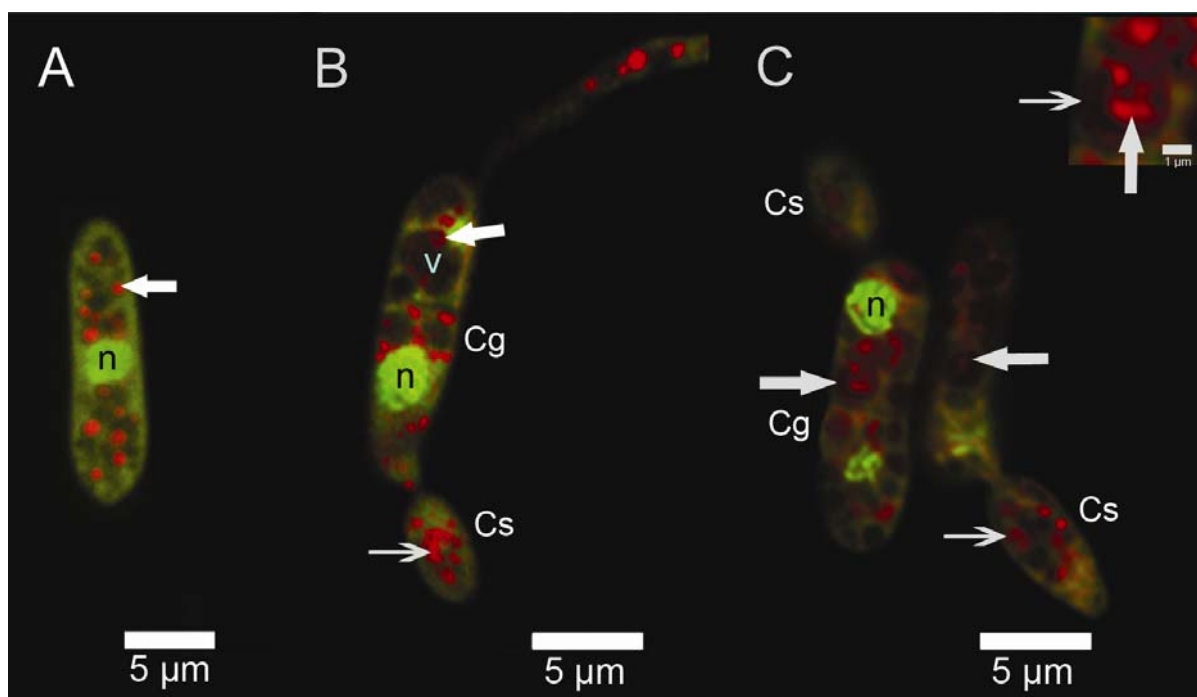
Conídio germinado corado com vermelho Nilo. Dezessete seções z LSCM foram processadas através de LaserSharp® Software. A – Reconstrução de luz transmitida mostrando um conídio secundário (Cs) e vacúolo no conídio germinado (seta). B – Vista frontal da pilha de séries z unidas. Os corpos lipídicos no conídio germinado (seta grossa) e no conídio secundário estão indicados (seta fina). C – A pilha de séries z é girada 90° horizontalmente. D – A pilha de séries z é girada 180°. Os corpos lipídicos no conídio germinado (seta grossa) e no conídio secundário (seta fina) estão apontados de outro ângulo.

FIGURA 25 - INTERNALIZAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS PELOS VACÚOLOS DURANTE A GERMINAÇÃO E FORMAÇÃO DE CONÍDIOS SECUNDÁRIOS



A - Microscopia de luz de conídios germinados (Cg). Observam-se conídio secundário (Cs) e apressório (Ap) melanizado. Um corpo lipídico dentro (seta grossa) e um próximo (seta fina) ao vacúolo (asterisco) estão evidenciados. B – Microscopia confocal com coloração com VN. Observa-se uma projeção de 37 séries z-axis dos conídios mostrados em A. O conídio secundário está repleto de corpos lipídicos (asterisco), enquanto os conídios germinados (1 e 2) apresentam poucos. Observa-se um corpo lipídico dentro (seta grossa) e um próximo (seta fina) ao vacúolo.

FIGURA 26 - VACÚOLOS VISTOS ATRAVÉS DE MARCAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA



Coloração com LA em microscópio confocal. A – Pequenos vacúolos (seta) dentro do conídio não germinado. O núcleo (n) aparece em verde. B – Conídio secundário (Cs) inicial com pequenos vacúolos (seta fina) e grandes vacúolos (v) com pequenas vesículas intravacuolares coradas (seta grossa) dentro do conídio primário germinado (Cg). O núcleo (n) está em verde. C – Observam-se estágios mais avançados da formação de conídios secundários (Cs), e pequenos vacúolos dentro dos conídios secundários (seta fina). Os grandes vacúolos (seta grossa) levemente marcados apresentam pequenas vesículas intravacuolares nos conídios primários germinados (Cg). O núcleo (n) é mostrado. Inseto: ampliação do vacúolo do conídio germinado da direita. Limites vacuolares (seta fina) e vesículas intravacuolares (seta grossa) são observados.

5.3 DINÂMICA DOS VACÚOLOS E LIPÍDEOS DURANTE A GERMINAÇÃO E ENVELHECIMENTO

5.3.1 Mobilização de Lipídeos e Vacuolização

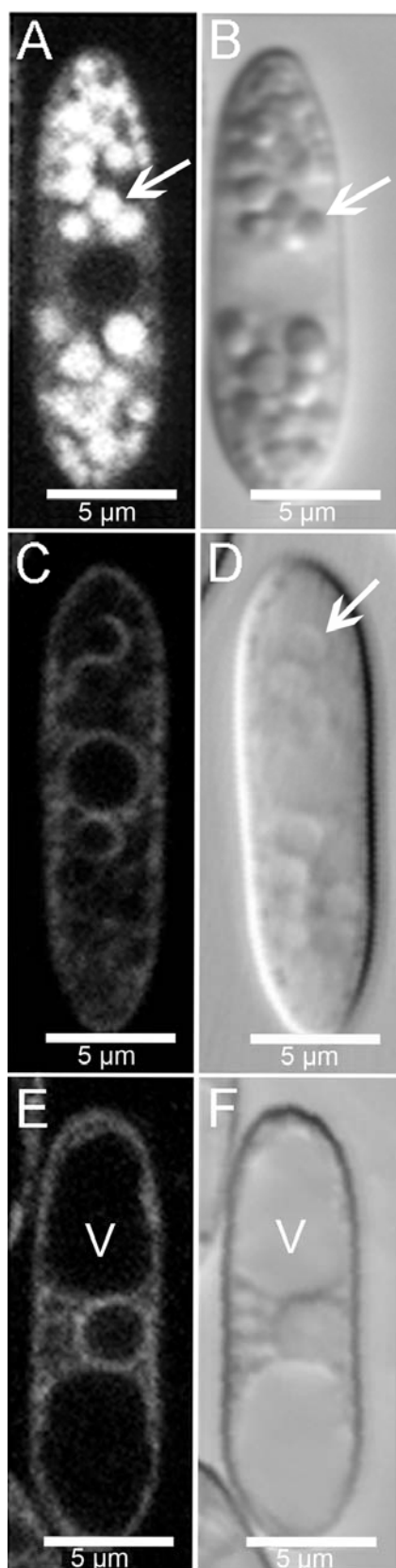
Conídios não germinados de culturas de duas faixas de idade foram analisados: a) conídios jovens - coletados de culturas de 2-5 dias; b) conídios velhos - coletados de culturas de 10 a 20 dias. Os conídios foram analisados por meio de DIC, microscopia confocal e MET.

Através de detecção citoquímica com vermelho Nilo foi possível monitorar o conteúdo lipídico dentro de células vivas. O citoplasma dos conídios não germinados jovens estava repleto de corpos lipídicos (fig. 27A-B). Já na maioria dos conídios velhos não foram observados corpos lipídicos (fig. 27E-F). Contudo, poucas células os apresentavam em menor número e algumas com conteúdo semelhante aos conídios jovens (resultados não mostrados). Isso se deve ao fato de que mesmo nas culturas velhas ainda acontecia a conidiogênese e, portanto, embora predominassem conídios velhos, eram encontrados também conídios mais jovens.

A diminuição do conteúdo lipídico durante o envelhecimento aconteceu simultaneamente à formação de grandes vacúolos, os quais apareciam mais escuros que o restante do citoplasma através de coloração com vermelho Nilo (fig. 27C e 27E) e como depressões através de DIC (fig. 27D e 27F). Estes vacúolos apresentavam, na maioria dos conídios, aspecto vazio através da coloração com VN e através de DIC (fig. 27E-F) e com poucas vesículas intravacuolares através da coloração com laranja de acridina (fig. 28C-E).

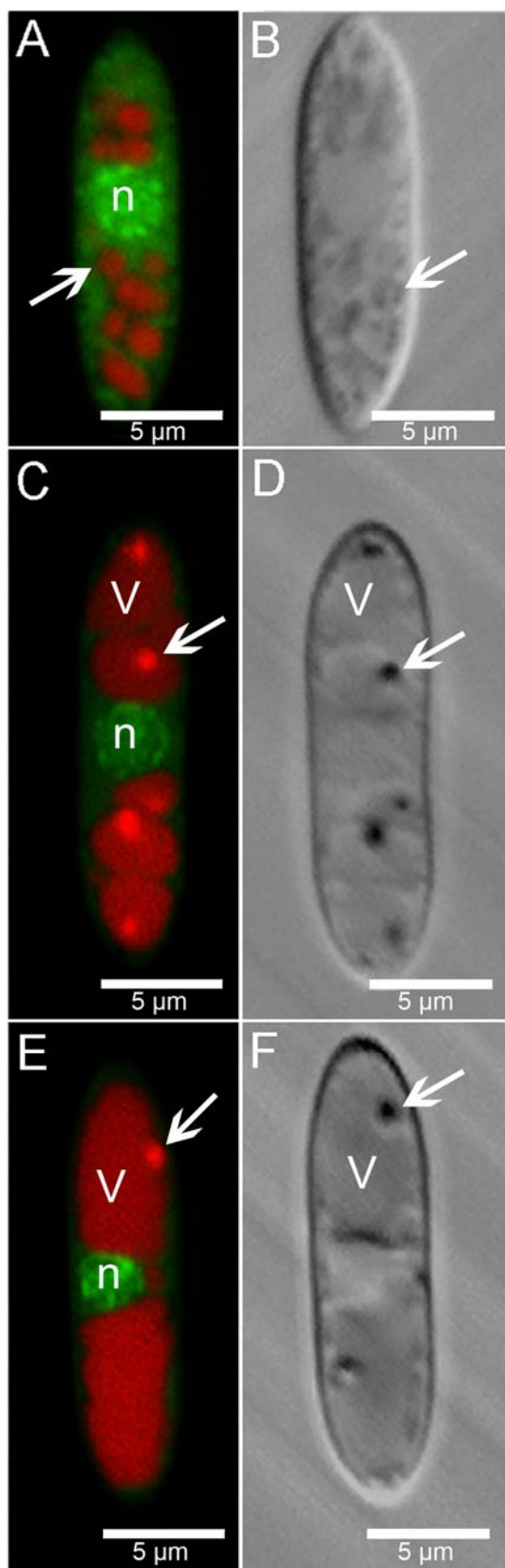
Estes resultados foram também observados através de MET. Conídios jovens apresentaram o citoplasma repleto de corpos lipídicos e pequenos vacúolos (figs. 9 A e 29A). Enquanto isso, os conídios velhos não apresentavam corpos lipídicos, mas sim grandes vacúolos (fig. 29B). Os vacúolos em alguns conídios velhos mostraram grande complexidade de membranas incluindo vesículas intravacuolares com membranas simples, membranas duplas e estruturas lamelares (fig. 29C-E). Invaginações da membrana vacuolar, indicando processo de microautofagia, foram freqüentemente observadas nos conídios velhos (fig. 29E).

FIGURA 27 - CORPOS LIPÍDICOS EM CONÍDIOS DURANTE O ENVELHECIMENTO



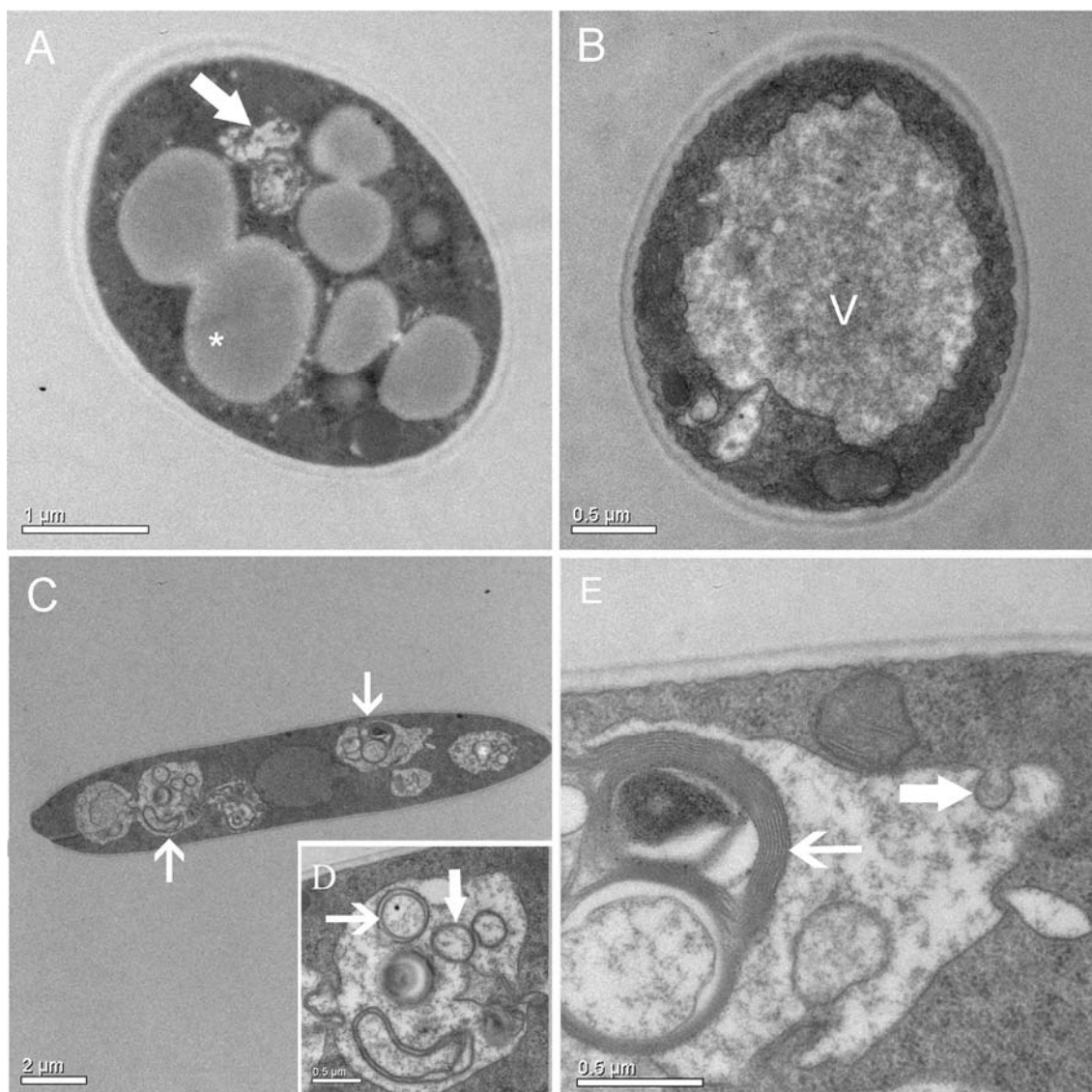
Conídios não germinados de diferentes idades. Coluna da direita: Análises de DIC. Coluna da esquerda: Coloração com VN em microscópio confocal. A-B: Observa-se um conídio jovem repleto de corpos lipídicos (setas). C-F: Conídios velhos. Não são observados corpos lipídicos. D - Os vacúolos são visualizados como depressões (seta). E-F: Dois grandes vacúolos (V) são observados no citoplasma.

FIGURA 28 - VACÚOLOS DE CONÍDIOS DURANTE O ENVELHECIMENTO



Coluna da direita: Análises de DIC. Coluna da esquerda: Coloração com LA em microscópio confocal. A – Observa-se um conídio jovem com vários vacúolos pequenos corados em vermelho (seta) e o núcleo (n) central em verde. B – Através de DIC os vacúolos são vistos como pequenas depressões no citoplasma (seta). C – Observa-se um conídio velho com vacúolos (V) maiores e vesículas intravacuolares mais intensamente coradas (seta), e o núcleo (n) em verde. D – Na imagem de DIC os vacúolos (V) representam depressões e as vesículas intravacuolares estão escuras (seta). E – Observa-se um conídio velho com dois grandes vacúolos (V) e uma vesícula intravacuolar (seta). F – Em DIC os vacúolos (V) aparecem como depressões, contendo vesículas intravacuolares escuras (seta).

FIGURA 29 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS CONÍDIOS JOVENS E VELHOS



Conídios não germinados de diferentes idades observados através de MET. A – Corte transversal de um conídio jovem. Observam-se grandes corpos lipídicos (asterisco) e pequenos vacúolos (seta). B – Conídio velho em corte transversal. Um grande vacúolo (v) ocupa a maior parte do volume celular. C – Corte longitudinal de um conídio velho mostrando vacúolos (setas) com grande quantidade de material intravacuolar. D – Detalhe de um vacúolo mostrando vesículas intravacuolares (seta grossa) e estruturas membranosas complexas (seta fina). E – Ampliação de um vacúolo da célula observada em C. Notam-se invaginações da membrana vacuolar (seta grossa) sugestiva de microautofagia, e estruturas lamelares (seta fina).

5.3.1.1 Internalização de lipídeos e autofagia

A internalização de lipídeos e outras estruturas celulares parece ser um fenômeno comum a todas as estruturas fúngicas analisadas. Corpos lipídicos em

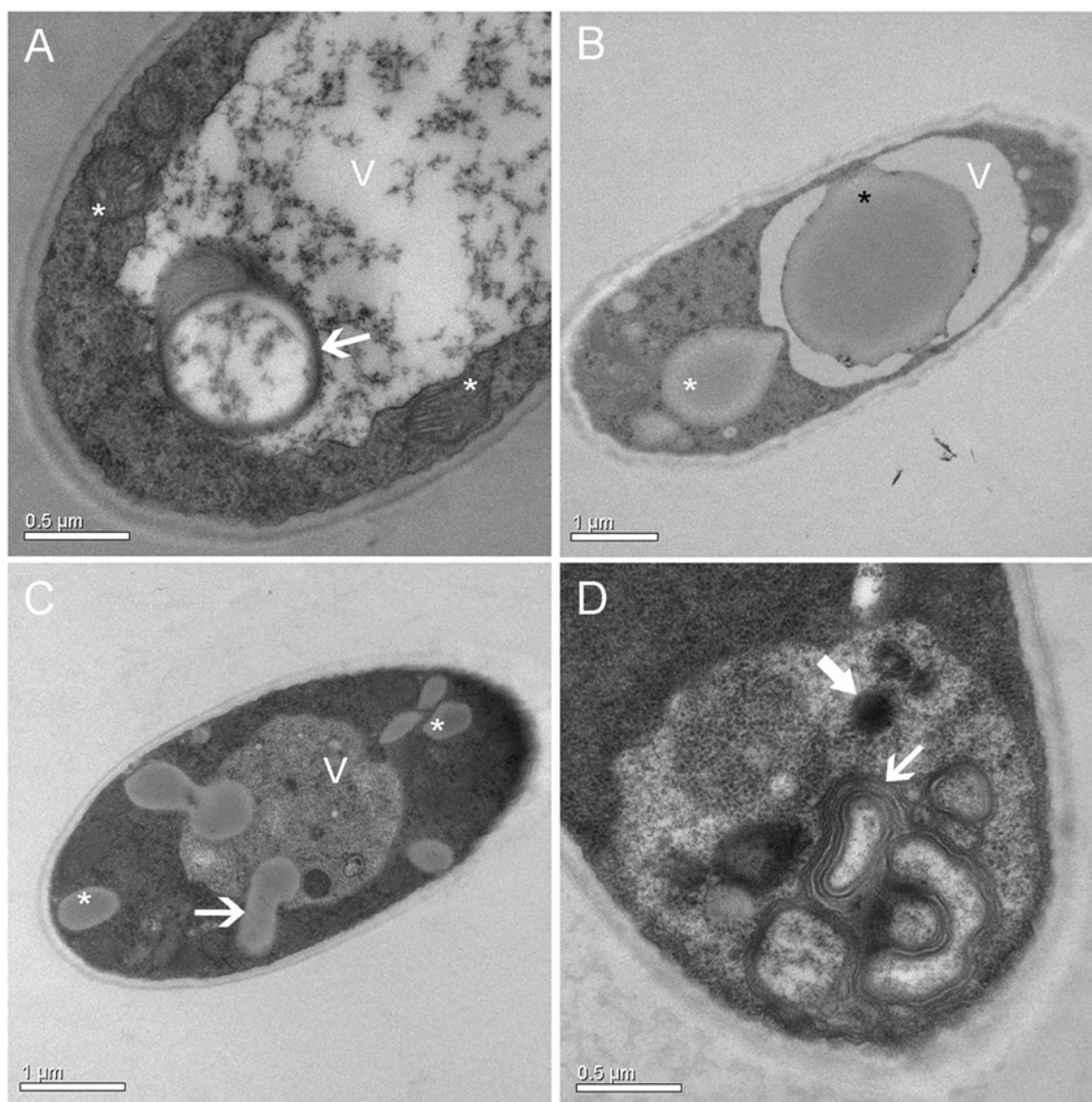
processo sugestivo de microautofagia e no interior de vacúolos, além de vesículas membranosas, foram observados em apressórios do controle (fig. 13) e tratados com o inibidor de síntese de melanina (fig. 16C-F). Resíduos membranosos no interior de grandes vacúolos foram muito evidentes nas hifas vacuolizadas das culturas em BDA (fig. 20B-C) e através de microscopia confocal foi possível observar corpos lipídicos no interior de vacúolos de conídios germinados, durante a formação de conídios secundários (fig. 25).

5.3.1.2 Inibição da digestão celular em conídios não germinados

Embora em conídios não germinados do controle fosse possível observar granulações intravacuolares ou corpos lipídicos (fig. 29C) a maioria das células não germinadas do controle apresentou vacúolos aparentemente vazios ou com poucas vesículas intravacuolares (figs. 27C-D, 28C-D, 29B e 30A). Com a finalidade de inibir a digestão intravacuolar das estruturas no interior do vacúolo foi empregado o PMSF, um inibidor de serina protease. Esta estratégia permite a visualização de conteúdos internalizados pelos vacúolos e não digeridos (MIZUSHIMA, 2004). Estes experimentos foram realizados em conídios velhos que apresentam vacúolos maiores, mais facilmente visualizados. Após o tratamento com PMSF observou-se grande acúmulo de granulações heterogêneas dentro dos vacúolos de conídios vivos não germinados sem qualquer marcação (filme 5). O número granulações intravacuolares era visivelmente maior nas células tratadas que nas células controle (filme 4).

Nas observações através de MET foram verificados estágios iniciais (fig. 30B) e mais adiantados (fig. 30C) da internalização de corpos lipídicos. Lipídeos no interior de vacúolos também foram encontrados (fig. 30B). Embora alguns conídios velhos não submetidos ao tratamento com PMSF também pudessem apresentar grande quantidade de conteúdo intravacuolar (fig. 29C), nos tratamentos com PMSF este conteúdo era observado na maior parte das células. Através de MET verificou-se que este conteúdo intravacuolar era formado por estruturas diversificadas, membranosas ou não (fig. 30D).

FIGURA 30 - MET DE CONÍDIOS NÃO GERMINADOS TRATADOS COM PMSF



A: Célula do controle. B-D: Células tratadas com PMSF. A – Observa-se o detalhe de um conídio com um grande vacúolo (V) contendo uma vesícula (seta). No citoplasma são observadas mitocôndrias (asteriscos). B – Observa-se um conídio com um grande corpo lipídico associado a uma pequena invaginação da membrana vacuolar (asterisco) e outro no interior do vacúolo (V). C – Conídio não germinado com dois corpos lipídicos entrando (seta) no vacúolo (V) e lipídeos no citoplasma (asteriscos). D – Detalhe de um conídio mostrando uma grande quantidade de vesículas intravacuolares (seta fina) e outros conteúdos não membranosos (seta grossa).

6. DISCUSSÃO

6.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DA GERMINAÇÃO NA PRESENÇA DO INIBIDOR DE SÍNTESE DE MELANINA

6.1.1 Germinação e Penetração em Membranas de Celofane

Os aspectos morfológicos da germinação verificados em *C. acutatum* no presente trabalho (figs. 2 e 4) estão de acordo com observações previamente descritas neste fungo (LEANDRO et al., 2001) e em *C. graminicola* (POLITIS; WHEELER, 1973; POLITIS, 1976; SCHADECK; LEITE; BUCHI, 1998a). Destaca-se a melanização do apressório, característica naturalmente esperada no gênero *Colletotrichum* (PERFECT et al., 1999; WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004). Neste gênero (PERFECT et al., 1999) e em outros fungos (MONEY; HOWARD, 1996) a melanização do apressório vem sendo considerada uma condição para que aconteça a penetração na parede celular do hospedeiro. A camada de melanina diminui a permeabilidade do apressório e promove o acúmulo das moléculas geradoras da pressão de turgor, como o glicerol proveniente da digestão dos lipídeos, e essa pressão é necessária para o crescimento da hifa de penetração a partir do poro (THINES; WEBER; TALBOT, 2000).

O número de apressórios melanizados com 48 horas de incubação e a maior penetração em membrana de celofane a partir destes (fig. 2, gráfico 1) é comparável à porcentagem de melanização e penetração observada em *C. lagenarium* no mesmo tempo de incubação (TSUJI et al., 1997). Entretanto, a penetração no celofane a partir de apressórios hialinos do controle (figs. 3 e 5, tabelas 1 e 2) foi um resultado inesperado, uma vez que os estudos clássicos em melanização de apressórios têm demonstrado que o apressório não melanizado não é capaz de penetrar a superfície da planta hospedeira ou de substratos sintéticos (SUZUKI et al., 1982; HOWARD; FERRARI, 1989; CHUMLEY; VALENT, 1990).

A carpropamida, produto inicialmente desenvolvido para inibir a biossíntese de melanina em *M. grisea* (JENNINGS et al., 2000), também inibiu a melanização do apressório em *C. acutatum* (figs. 2 e 6), como descrito para *C. lagenarium* (TSUJI et al., 1997). Esse fato é explicado por JENNINGS e colaboradores (2000) como sendo

resultado da ação inibitória da carpropamida sobre a scitalona desidratase. A scitalona desidratase catalisa a desidratação de scitalona e vermelona, os quais são precursores de melanina (JENNINGS et al., 2000). No entanto, os apressórios hialinos formados na presença de carpropamida freqüentemente penetraram as membranas de celofane (figs. 2 e 6), fato observado através de DIC, sem qualquer coloração, e confirmado através de coloração com vermelho Nilo em microscopia confocal, que permitiu a observação de fatias ópticas (GOLD; GARCÍA-PEDRAJAS; MARTÍNEZ-ESPINOZA, 2001) no interior do celofane.

A ocorrência de penetração a partir de apressórios hialinos reforça a idéia de que a melanização do apressório não está sendo vital para a penetração de *C. acutatum*, pelo menos nas membranas utilizadas. Tal fato contradiz trabalhos com outras espécies, como *C. lagenarium*, em que os apressórios hialinos tratados com carpropamida não puderam penetrar as membranas de celofane (TSUJI et al., 1997). Estes resultados sugerem que espécies do mesmo gênero podem apresentar comportamentos diferentes em relação à necessidade de melanização para a penetração do apressório. Estudos futuros devem ser realizados para confirmar se os resultados obtidos *in vitro* ocorrem da mesma forma nas folhas e frutos do morangueiro.

Pelo acima exposto, a deficiência de melanina não impediu a penetração do apressório em *C. acutatum*. Assim, a pergunta que surge é: quais são os principais fatores responsáveis pela penetração neste caso?

Além da entrada indireta dos conídios germinados através de estômatos, injúrias ou folículos capilares (HALL, 1971; REHNSTROM; FREE, 1996), a invasão dos tecidos da planta pode ocorrer de duas maneiras diferentes, penetração mecânica, representada pela pressão de turgor, ou penetração enzimática. Uma série de trabalhos tem demonstrado a importância das enzimas na penetração do hospedeiro em fungos que produzem apressórios melanizados (PASCHOLATI et al., 1993), hialinos (PRYCE-JONES; CARVER; GURR, 1999) ou que não possuem apressórios conhecidos (DAVIES et al., 2000). PASCHOLATI e colaboradores (1992) demonstraram que cutinases estão envolvidas no processo de penetração de *C. graminicola*, fungo que produz apressórios melanizados como *C. acutatum*, devido à sua relação com o processo de adesão à superfície hospedeira. Na espécie *E. graminis*, que produz apressório não melanizado, a penetração da parede da

planta se dá através da combinação do fator enzimático e de força mecânica (PRYCE-JONES; CARVER; GURR, 1999). *E. graminis* é o primeiro fitopatógeno para o qual esta estratégia de penetração é proposta. Entretanto, como a força mecânica é gerada na ausência de melanina não se sabe (PRYCE-JONES; CARVER; GURR, 1999).

A diferença de necessidade de melanina para a patogênese já foi demonstrada para diferentes variedades da mesma espécie. Enquanto a melanina é necessária em *G. graminis* variedade *tritici* para a patogênese em trigo, *G. graminis* variedade *graminis* não requer a presença desse pigmento para infecção do arroz (FREDERICK et al., 1999). Em *G. graminis* variedade *graminis*, a produção de enzimas está inversamente relacionada com a pigmentação da hifa, pois o seu mutante não melanizado possui maior atividade de enzimas extracelulares que o tipo selvagem (FREDERICK et al., 1999). Neste caso, propõe-se que a perda de melanização seja compensada por um aumento de enzimas hidrolíticas, as quais favorecem a invasão pelo fungo (HENSON; BUTLER; DAY, 1999). Assim, é possível que, em nossas condições experimentais, *C. acutatum* compense a ausência de melanina produzindo mais enzimas hidrolíticas.

O bloqueio da fluorescência nos apressórios completamente melanizados (fig. 4) forneceu outra perspectiva. Este fenômeno pode ser decorrente da diminuição da permeabilidade da parede celular aos corantes fluorescentes, uma vez que se atribui à melanina a capacidade de diminuir a permeabilidade do apressório (THINES; WEBER; TALBOT, 2000). Contudo, deve-se considerar também que a melanina pode impedir a passagem dos comprimentos de onda utilizados, já que a proteção contra radiações é uma das funções mais bem estabelecidas deste polímero (REHNSTROM; FREE, 1996; JACOBSON, 2000). Independente dos mecanismos descritos acima, a fluorescência observada nos apressórios hialinos (figs. 4, 5 e 6) demonstra que aconteceu a captação dos corantes laranja de acridina e vermelho Nilo, corantes vitais que atravessam as membranas de células vivas. Logo, a parede celular dos apressórios não melanizados foi permeável a estes compostos.

Dentro deste contexto, o apressório não melanizado poderia desenvolver um mecanismo compensatório, que promova a pressão de turgor para garantir a penetração, uma vez que se acredita que em fungos formadores de apressórios melanizados a força mecânica desempenha importância maior para a penetração

que a dissolução enzimática da cutícula (HOWARD et al., 1991). Polímeros de quitina, por exemplo, parecem ser essenciais para a manutenção da pressão de turgor em *C. graminicola*, mesmo na ausência de melanina, por proporcionarem rigidez à parede, evitando o rompimento do apressório que poderia ser causado pela alta pressão hidrostática (DEISING; WERNER; WERNITZ, 2000). O acima exposto permite construir a hipótese de que em *C. acutatum* a parede celular dos apressórios hialinos poderia sofrer modificações e, assim, produzir resistência mecânica suficiente para conter o citoplasma com alta pressão osmótica. Esta pressão, nestas condições, poderia estar sendo gerada pelo conjunto da membrana plasmática e toda a arquitetura celular, à semelhança do que ocorre durante o crescimento de células vegetais (ALBERTS et al., 2004). Além disso, não podemos excluir o fato de que o substrato utilizado possa estar oferecendo baixa resistência à penetração. O celofane é formado somente por celulose, diferentemente das complexas paredes celulares dos vegetais do hospedeiro.

6.1.2 Acúmulo de Corpos Lipídicos nos Conídios Tratados com Carpropamida e Sacarose

O aparente acúmulo de corpos lipídicos no citoplasma dos conídios germinados incubados com carpropamida e sacarose (figs. 6 e 8) quando comparados ao controle (incubado na presença apenas de água), foi confirmado através das análises de imagens do conteúdo lipídico. Softwares para análise de imagem têm sido recentemente utilizados para o estudo de fungos fitopatogênicos. Alguns autores têm chamado atenção para o fato da análise digital de imagens poder fornecer uma outra dimensão ao estudo microscópico de fitopatógenos, sem o uso de técnicas caras e que consomem muito tempo (DIÉGUEZ-URIBEONDO; FÖRSTER; ADASKAVEG, 2003). Características fisiológicas, por exemplo, têm sido quantificadas utilizando-se corantes fluorescentes (PONS et al., 1998), como o vermelho Nilo utilizado nesse trabalho. As análises estatísticas dos dados obtidos na análise de imagens indicaram que a área total de corpos lipídicos encontrada nas células germinadas foi significativamente maior no controle incubado com sacarose e no tratamento com carpropamida que no controle incubado na presença apenas de água (tabela 3). Esse acúmulo de corpos lipídicos nos conídios germinados

sugere a interferência da carpropamida e da sacarose na síntese ou consumo de triacilgliceróis.

Trabalhos anteriores demonstraram que a adição de sacarose ao meio de incubação funciona como ativador da germinação, promovendo cerca de 100% de germinação nos conídios de *C. acutatum* (BARBOSA, 2005). No presente trabalho a sacarose funcionou como controle positivo de fonte de carbono disponível para o acúmulo de lipídeos durante a germinação (fig. 8 e tabela 3). É possível que o carboidrato adicionado tenha sido internalizado por via endocítica, e hidrolisado nos vacúolos. A hidrólise do dissacarídeo por enzimas extracelulares também pode ter acontecido, uma vez que fungos secretam inúmeras hidrolases (HERBERT et al., 2004). Os monossacarídeos resultantes podem ter sido utilizados em parte das funções vitais dos conídios germinados, acontecendo uma economia dos lipídeos armazenados, ou como substrato para a síntese de lipídeos.

Os fungos também produzem enzimas capazes de decompor compostos orgânicos, entre as quais estão a lignina peroxidase e lacase, enzimas envolvidas na degradação de compostos como a lignina (KUHAD et al., 1997). O sistema enzimático de degradação da lignina se caracteriza por baixa especificidade (TIEN; KIRK, 1983). Esta propriedade em basidiomicetos tem sido bastante explorada, uma vez que atribui aos fungos lignolíticos a capacidade de degradar compostos complexos, como os poluentes presentes no solo e na água (FERREIRA-LEITÃO; SILVA; BON, 2003). A lacase promove a desmetilação das cadeias poliméricas da lignina e faz a decomposição de macromoléculas, pelo rompimento de anéis aromáticos e de ligações entre carbonos das estruturas fenólicas (DURAN; ESPÓSITO, 2000). Dessa maneira, os esqueletos de carbono oriundos dos polissacarídeos da madeira são disponibilizados para utilização pelo fungo. Além disso, estudos demonstram que a lacase é produzida em situações de baixa concentração de glicose (WONG; YU, 1999), e parece ser necessária para a penetração por alguns fungos (MENDGEN; HAHN; DEISING, 1996). A lignina peroxidase também ocorre em condições de meio com carência nutricional (WONG; YU, 1999). Espécies do gênero *Colletotrichum*, por sua característica de fitopatógeno, produzem uma série de enzimas capazes de degradar componentes estruturais das plantas (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004), como cutinases, celulasas e proteases (BAILEY et al., 1992). Outras enzimas como

pectina liases estão envolvidas na degradação da parede celular da planta pelo gênero *Colletotrichum* (BAILEY et al., 1992). Portanto, uma possibilidade é que enzimas possam estar envolvidas na degradação da carpropamida por *C. acutatum* após determinado período de incubação, tornando algumas moléculas disponíveis para o fungo. O potencial de metabolizar resíduos tóxicos tem sido investigado em uma série de fungos com o objetivo de empregá-los como micorremediadores (KUNS et al., 2002). O fato de *C. acutatum* possivelmente estar utilizando suas enzimas para metabolizar um fungicida como a carpropamida, que possui longa permanência no ambiente (KURAHASHI; HÄNßLER, 1998) abre um novo campo de pesquisa no que se refere à remoção de contaminantes do meio ambiente. Além disso, é possível especular que haja um outro alvo da carpropamida em fungos (além da conhecida inibição de síntese de melanina), que possa estar atuando na produção de diferentes enzimas pelo fungo. Em plantas por exemplo, sabe-se que a carpropamida estimula a síntese de fitoalexinas, compostos tóxicos produzidos por plantas em resposta ao ataque de patógenos e outros tipos de estresse (KURAHASHI, 1999). Futuras análises deverão investigar quais as possíveis enzimas envolvidas na degradação da carpropamida.

Consideremos ainda que a DHN melanina é sintetizada a partir de acetil-CoA e malonil-CoA (GEIS; WHEELER; SZANISZLO, 1984; LANGFELDER et al., 2003). É possível que o acetil-CoA (substrato para a síntese de malonil-CoA) seja proveniente da β -oxidação dos ácidos graxos produzidos pela digestão dos triacilgliceróis dos corpos lipídicos (THINES; WEBER; TALBOT, 2000). Consequentemente, nos conídios germinados tratados com carpropamida a economia de lipídeos também poderia ser decorrente da inibição da síntese de melanina.

No caso do conídio não germinado, no qual não está acontecendo o consumo acelerado de corpos lipídicos como ocorre na germinação, ficou mais claro que a adição de carpropamida aumenta o conteúdo de corpos lipídicos (filme 1) ao ponto de alterar o formato dos conídios (fig. 9). O acinturamento dos conídios incubados com carpropamida e sacarose já havia sido mostrado anteriormente (BARBOSA, 2005). Estes resultados indicam grande aumento do conteúdo lipídico, ao ponto de promover remodelagem da parede celular com conseqüente deformação dos conídios nas áreas de armazenamento.

O papel dos corpos lipídicos no armazenamento de energia e seu consumo durante a germinação será discutido adiante (ver item 6.2.2).

6.1.3 Matriz Extracelular

Uma característica comumente encontrada nos conídios germinados, tanto no controle quanto após tratamento com carpropamida, foi a presença de matriz extracelular bem desenvolvida ao redor dos apressórios e algumas vezes dos tubos germinativos (figs. 10, 11 e 12). A matriz extracelular observada está classicamente relacionada à adesão do tubo germinativo e apressório à superfície hospedeira (VAN DYKE; MIMS, 1991; XIAO et al., 1994). Mesmo depois de todo o processamento utilizado para microscopia eletrônica, grande quantidade de conídios germinados permaneceu aderida à lamínula de vidro, permitindo a observação da matriz (figs. 10, 11 e 12).

Os diferentes graus de deposição de matriz extracelular (figs. 11 e 12) indicaram a secreção crescente à medida que o apressório amadurecia, em concordância com a proposta de que a maturação do apressório em espécies de *Colletotrichum* envolve a secreção de materiais de matriz extracelular (PERFECT et al., 1999). Em *E. graminis*, a ocorrência do anel de matriz extracelular encontrado aqui ao redor dos apressórios, tem sido descrito nos sítios de penetração (PRYCE-JONES; CARVER; GURR, 1999). Assim, também se tem atribuído à matriz extracelular participação nas forças que atuam na penetração (PRYCE-JONES; CARVER; GURR, 1999). A presença da matriz também parece estar relacionada à formação de um ambiente específico no qual certas enzimas, como cutinases e esterases, são secretadas e direcionadas para sítios de invasão (SUGUI, 1998). O envolvimento dessas enzimas no processo de adesão à superfície hospedeira e preparação para infecção tem sido proposto (MENDGEN; HAHN; DEISING, 1996). A forte adesão do apressório, por exemplo, é necessária para que a pressão de turgor seja efetiva (HOWARD; FERRARI, 1989; HOWARD et al., 1991), por se contrapor à força exercida na superfície pela hifa de penetração se formando na base do apressório (DEISING; WERNER; WERNITZ, 2000). É possível que o apressório não melanizado também compense a deficiência de melanina com alterações na produção da matriz extracelular ao redor do apressório. Outros autores têm relatado

a secreção alterada de mucilagem em condições de mudança de pigmentação na parede, ou uma correlação inversa entre a secreção de mucilagem e a porosidade da parede celular fúngica (HENSON; BUTLER; DAY, 1999).

Resumindo, o processo de penetração citado no item 6.1.1 é um estágio determinante em qualquer interação planta patógeno (HOWARD; VALENT, 1996). Logo, é possível que as habilidades de perceber e aderir ao substrato, secretar enzimas que degradam parede celular e exercer pressão no substrato, as quais podem ser moduladas em cada fungo (MENDGEN; HAHN; DEISING, 1996), estejam sendo coordenadas em *C. acutatum* de maneira a compensar a falta de melanina.

6.1.4 Estudos Ultraestruturais

Os procedimentos empregados para o processamento em microscopia eletrônica, tanto de transmissão quanto de varredura, mostraram-se eficientes. A presença de corpos lipídicos no apressório (figs. 15 e 16) e no conídio não germinado (fig. 9) confirma os resultados obtidos através de microscopia confocal (figs. 5 e 6). Além disso, a preservação destas estruturas indica que a fixação foi adequada, uma vez que são organelas muito lábeis e difíceis de serem conservadas (MURPHY, 2001). Este resultado adquire grande importância, visto que a microscopia eletrônica através da fixação química em fungos tem sido considerada ineficiente, dando-se preferência para técnicas que envolvem crio-fixação (MIMS, 1991). No entanto, através destas metodologias os lipídeos são totalmente extraídos, fato que as inviabiliza em estudos que enfocam corpos lipídicos.

Era esperado que os apressórios do controle apresentassem uma camada de melanina bem definida e eletrodensa, como observado em outros fungos (BOURETT; HOWARD, 1990; HOWARD; FERRARI, 1989; O'CONNELL et al., 1985; SCHADECK; BUCHI; LEITE, 1998b; VAN DYKE; MIMS, 1991). Contudo, apenas em algumas células do controle foi encontrada uma grande camada eletrodensa (fig. 14), que provavelmente representa melanina. Essa hipótese é corroborada pela ausência dessa camada nas células tratadas com carpropamida (fig. 16), as quais apresentaram apenas apressórios hialinos nas análises em microscopia de luz e DIC. Outros autores reportaram o desaparecimento da camada eletrodensa de melanina depositada na parede celular nos tratamentos com inibidores de melanina

(O'CONNELL et al., 1985; VAN DYKE; MIMS, 1991). A espessa camada eletrodensa e a presença do poro na base do apressório (fig. 14) concordam com trabalho anterior em *C. acutatum* (DIÉGUEZ-URIBEONDO; FÖRSTER; ADASKAVEG, 2003). Os autores demonstraram camada semelhante, muito escura e espessa e o poro do apressório através de microscopia de luz.

No apressório destacou-se a proeminente e abundante presença de vacúolos e vesículas com material eletrodense (figs. 15 e 16), fenômeno anteriormente observado em apressório de *C. graminicola* sobre folhas de milho e aveia (POLITIS; WHEELER, 1973; POLITIS, 1976) e em membranas de celofane (SCHADECK; LEITE; BUCHI, 1998a). Os grânulos eletrodensos encontrados próximos e no interior da parede celular dos apressórios juntamente com as invaginações da membrana citoplasmática na região destas granulações (figs. 15 e 16) podem ser uma evidência de processo secretório. Um grande número de vesículas secretórias com conteúdo eletrodense já foi descrito no citoplasma de *Peronospora parasitica* concentrado próximo à membrana plasmática dos apressórios (CARZANIGA; BOWYER; O'CONNELL, 2001). O material secretado provavelmente não representa melanina, uma vez que nos conídios tratados com o inibidor de síntese de melanina ele também foi observado (fig. 16).

De acordo com outros autores, mesmo que o material eletrodense desapareça depois de tratamento com triciclazol, esse material não é necessariamente melanina (HENSON; BUTLER; DAY, 1999). Por exemplo, resultados mostrando que não foi observada a fusão do material eletrodense com a parede do hifopódio de *G. graminis*, e que ele não é evidenciado com marcação para melanina, sugerem que o conteúdo eletrodense provavelmente não representa “melanosomas”, mas sim inclusões de osmólitos (HENSON; BUTLER; DAY, 1999). No nosso caso, como as granulações não foram encontradas apenas na parede celular do controle, mas também nas células do tratamento com o inibidor de melanização, diminui ainda mais a probabilidade de essas granulações estarem relacionadas à deposição de melanina.

Em fungos, a literatura atual ainda é inconclusiva sobre a presença de melanosomas (LANGFELDER et al., 2003), organela na qual acontece a síntese de melanina em células animais (MARKS; SEABRA, 2001). Entretanto, em *F. pedrosoi*, fungo patógeno humano, verificou-se que a melanina é sintetizada intracelularmente

e depois transportada para a parede celular (SILVA et al., 2005). Nesse caso, a síntese da melanina parece ocorrer em vesículas acídicas presentes no citoplasma (SILVA et al., 2005), as quais têm sido denominadas estruturas semelhantes à melanosomas (FRANZEN et al., 1999). Também existem evidências de que os precursores de melanina no fitopatógeno *G. graminis* são sintetizados no citoplasma e convertidos em melanina nas paredes celulares do apressório, hifopódio ou hifas (BELL; WHEELER, 1986; HENSON; BUTLER; DAY, 1999).

Por outro lado, sabe-se que durante a germinação ocorre uma secreção adicional de matriz extracelular (BRAUN; HOWARD, 1994), confirmada neste trabalho (figs. 10, 11 e 12). Estudos ultraestruturais de conídios de diferentes espécies de *Colletotrichum* revelaram que, nos conídios germinados, as paredes celulares estavam cobertas com uma camada de material fibrilar, o qual era mais eletrodenso do que a parede celular (VAN DYKE; MIMS, 1991; MIMS et al., 1995). Assim, uma hipótese é que o material secretado pelos apressórios contenha componentes da matriz extracelular, uma vez que esta foi encontrada com frequência cobrindo a parede dos apressórios do controle e tratamento com o inibidor de síntese de melanina.

6.2 CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE CONÍDIOS DE *C. acutatum*

6.2.1 Conidiogênese em Culturas

A intensa conidiogênese observada na superfície do micélio (figs. 18 e 20) concorda com a descrição das colônias de *C. acutatum* como uma massa de esporos alaranjada (LEANDRO et al., 2001). Na planta, esses esporos são liberados do acérvulo juntamente com uma porção de mucilagem (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004).

O processo de conidiação macrocíclica, no qual os esporos ou conídios podem se formar diretamente de hifas somáticas ou de células conidiogênicas especializadas (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996) foi demonstrado em *C. acutatum* (figs. 18 e 19). Assim, os conídios se desenvolveram a partir dos lados ou extremidades de uma hifa (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). As células conidiogênicas encontradas (figs. 18 e 19), formadas de ramificações das

hifas, são chamadas de fiálides para o gênero *Colletotrichum* (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Os aspectos citológicos observados aqui, especialmente o septo basal que separava os conídios das células conidiogênicas (fig. 18), indicam conidiogênese do tipo blástica, na qual o conídio sofre elongação e aumenta antes de ser separado pelo septo (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Os conídios formados (figs. 18 e 19) eram hialinos, com formato tipicamente alongado e extremidades arredondadas características de espécies de *Colletotrichum* (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

O material fibrilar encontrado cobrindo a parede celular das hifas conidiogênicas e conídios em formação tem sido descrito como um tipo de matriz extracelular, a qual parece estar frequentemente envolvida no desenvolvimento de fungos, tanto na germinação quanto no crescimento de hifas e esporulação (CARVER et al., 1995). Em espécies de *Colletotrichum*, a presença de uma camada de material fibrilar mais eletrodensa que a parede celular foi detectada, através de criofixação, cobrindo a parede de conídios não germinados e germinados (VAN DYKE; MIMS, 1991; MIMS et al., 1995).

Os resultados de MET mostrando a vacuolização das hifas eram esperados (fig. 20), uma vez que com o decorrer do tempo espera-se que aconteça a depleção de nutrientes. As hifas intensamente vacuolizadas e exibindo características de degeneração celular nestas áreas demonstraram privação de nutrientes e envelhecimento. Apesar de os fatores regulatórios do controle de eventos morfogênicos durante a formação de conídios e modificações das hifas não serem ainda compreendidos em *C. acutatum*, os resultados sugerem que o estresse nutricional está envolvido no começo da diferenciação dos conídios, como observado em outros fungos (SLADE et al., 1987). Estudos mais profundos devem clarificar estas questões.

6.2.2 Germinação, Formação de Conídios Secundários e Mobilização de Lipídeos

A morfologia geral dos tubos germinativos e apressórios (fig. 21) foi similar àquela observada em *C. graminicola* (SCHADECK; LEITE; BUCHI, 1998a) e *C. acutatum* (LEANDRO et al., 2001). Os variados padrões de germinação encontrados neste trabalho (figs. 21 e 25) estão de acordo com as descrições em *C. acutatum*

germinado sobre folhas e lamínulas de vidro (LEANDRO et al., 2001). O septo transversal central nos conídios germinados (fig. 23) também já foi descrito por LEANDRO et al. (2001).

A conidiação microcíclica (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996) se caracteriza pela formação de um ou mais conídios, os conídios secundários, após a germinação e antes do crescimento micelial, diretamente do conídio germinado ou de outras estruturas, como tubo germinativo (SMITH et al., 1981; LEANDRO et al., 2001). No presente trabalho, a formação de conídios secundários também foi demonstrada diretamente do conídio primário, sem a formação de tubo germinativo ou apressório.

A abundância de corpos lipídicos observada nos conídios secundários de *C. acutatum* (fig. 25) foi similar à encontrada nos conídios não germinados (figs. 9 e 27), como descrito em outras espécies de *Colletotrichum* (KERRIGAN; MIMS, 1993; MIMS et al., 1995; SCHADECK; LEITE; BUCHI, 1998a). Uma vez que o conídio secundário eventualmente irá germinar e promover a infecção do hospedeiro, é coerente com seu papel o acúmulo de corpos lipídicos. Durante a germinação, os triacilgliceróis armazenados nos corpos lipídicos são hidrolisados, produzindo glicerol e ácidos graxos (THINES; WEBER; TALBOT, 2000). Os ácidos graxos são utilizados nas diferentes rotas bioquímicas de transformação de energia e na formação de substratos para atividades de síntese (através do ciclo do glixilato), suprimindo grande parte das necessidades do acelerado metabolismo da germinação (WEETE, 1984). O glicerol se acumula no apressório e é responsável pela pressão de turgor necessária para o processo de penetração em espécies como *M. grisea* (THINES; WEBER; TALBOT, 2000). Em adição a isso, um dos precursores da via policetídea de síntese de melanina, o malonil-CoA (LANGFELDER et al., 2003), pode ser formado a partir dos ácidos graxos oriundos da digestão dos triacilgliceróis dos corpos lipídicos (THINES; WEBER; TALBOT, 2000).

Além do consumo, demonstrado pela diminuição de corpos lipídicos, durante a germinação com formação somente de tubo germinativo e apressório (figs. 4 e 5) os lipídeos também foram transferidos para o conídio secundário (figs. 24 e 25). Isso mostra que os conídios primários armazenam energia suficiente para a germinação e para a formação dos conídios secundários, uma vez que a incubação foi feita na ausência de nutrientes exógenos (LEANDRO et al., 2001).

Os vacúolos e vesículas observados no presente trabalho tanto no conídio germinado como no conídio secundário estão descritos em diferentes estruturas fúngicas (MIMS et al., 1995; SCHADECK; BUCHI; LEITE, 1998b). Estes compartimentos podem exercer várias funções, entre elas: lisosomal, de armazenamento de substâncias, controle da homeostase, do pH e da concentração de íons no citosol (KLIONSKY; HERMAN; EMR, 1990). A captura de laranja de acridina pelos vacúolos indica um baixo pH dentro destas estruturas, o que é característico de sistemas lisosomais (ANDERSON; ORCI, 1988). A vacuolização dos conídios germinados de *C. acutatum* já foi demonstrada durante a germinação (SCHADECK; BUCHI; LEITE, 1998b) e envelhecimento (MIMS et al., 1995) em conídios de *C. graminicola*. As vesículas intravacuolares mais intensamente marcadas e a morfologia variável (fig. 26) demonstram que os vacúolos são sistemas bastante complexos e versáteis. A reorganização de pequenos vacúolos no conídio secundário (fig. 26), mesmo durante os seus estágios iniciais de formação, indica que os vacúolos têm um importante papel nestas células. Um desses papéis se refere à mobilização de lipídeos. Nossos resultados revelaram que ocorre internalização de lipídeos pelos vacúolos de conídios germinados (fig. 25) e vacúolos de estruturas de infecção como os apressórios (fig. 13). Os resultados mostrando a mobilização de lipídeos (CARMO et al., 2003a) e a vacuolização durante a germinação já haviam sido descritos anteriormente em nosso laboratório para *C. acutatum* (CARMO et al., 2003b). Assim, a digestão vacuolar dos corpos lipídicos (no conídio germinado) ocorre simultaneamente ao armazenamento de corpos lipídicos durante a formação de conídios secundários, sugerindo um complexo trabalho de regulação dos processos catabólicos e anabólicos durante a vacuolização e formação de conídios secundários em *C. acutatum*.

6.2.3 Formação de Conídios Secundários, Tubos Germinativos e Apressórios Secundários na Presença de Carpropamida

Uma característica encontrada na germinação na presença de carpropamida, assim como no controle, foi a formação de conídios secundários (fig. 7), também previamente observados nesta espécie por LEANDRO e colaboradores (2001).

A produção de conídios secundários é influenciada por diversos fatores, incluindo aqueles que inibem o desenvolvimento das hifas, como a deficiência de nutrientes e o estresse causado por altas temperaturas (SMITH et al., 1981). De acordo com LEANDRO e colaboradores (2001), a formação de conídios secundários em *C. acutatum* pode estar relacionada a inibidores de germinação. A micosporina alanina, por exemplo, é um auto-inibidor da germinação presente na mucilagem de conídios de *C. graminicola* (LEITE; NICHOLSON, 1992).

A diferença na porcentagem de conídios secundários entre controle e tratamento, com 24 horas de incubação, foi significativa nas maiores concentrações de carpropamida (tabela 1). A germinação dos conídios é um processo regulado por múltiplos fatores e vias, cada um suscetível a estímulos ambientais particulares, possivelmente em combinações particulares (OSHEROV; MAY, 2001). Da mesma maneira, a formação de conídios secundários pode não ser resposta a uma única condição ambiental (PINHO et al., 2001). Pode-se especular que o aumento de conídios secundários está relacionado ao estresse causado no sistema pelo fungicida, que induziria a multiplicação para sobrevivência do fungo. Outros autores têm evidenciado o papel da conidiação secundária como fonte de inóculo para futuras infecções (LEANDRO et al, 2001). No processo de conidiação secundária ou microcíclica novos conídios são produzidos rapidamente (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Com o aumento do período de incubação o estresse também é maior e assim a resposta de proliferação, ou seja, o aumento do número de conídios secundários, tende a aumentar, como aconteceu, inclusive no controle, com 48 horas (gráfico 1). Outros experimentos visando esclarecer a questão dos fatores que interferem na formação de conídios secundários precisam ser realizados para o entender esse processo tão importante para os fungos.

A carpropamida não afetou o índice germinativo, uma vez que o número de conídios não germinados foi igual ao controle (tabelas 1 e 2). Este resultado está em concordância com resultados prévios que indicam que este composto não exibe ação direta no crescimento do fungo *M. grisea* (KURAHASHI; HÄNßLER, 1998; KURAHASHI, 2001). Porcentagem de germinação semelhante entre o controle e os tratamentos com carpropamida também foi encontrada em conídios de *C. lagenarium* (TSUJI et al., 1997).

Apesar de não impedir a germinação dos conídios, outros padrões na germinação foram afetados pela carpropamida (além dos conídios secundários discutidos acima): a) menor número de apressórios e hifas de penetração nas concentrações maiores; b) aumento da ocorrência de apressórios secundários em algumas concentrações de carpropamida nos dois períodos de incubação; c) maior frequência de tubos germinativos nas maiores concentrações de carpropamida nos dois períodos quando comparada à do controle. Embora o conjunto destes resultados sugira estresse e alterações na fisiologia celular, demonstra também que o fungo tem uma grande capacidade adaptativa conseguindo, apesar do composto químico adicionado e das suas conseqüências, formar apressórios e penetrar nas membranas, com a finalidade de colonizar novos nichos.

6.3 DINÂMICA DOS VACÚOLOS E LIPÍDEOS DURANTE A GERMINAÇÃO E ENVELHECIMENTO

As colônias de *C. acutatum* demonstraram expressivas mudanças durante o envelhecimento. Os conídios foram cultivados em meio BDA sólido (fig. 17), sem a substituição de nutrientes. De acordo com LEITE e NICHOLSON (1992), os conídios mantidos em cultura estão em um ambiente úmido e com o tempo começam a envelhecer e eventualmente perdem viabilidade. Por outro lado, quando os conídios são secos e permanecem na presença da camada de matriz extracelular eles continuam viáveis por um longo período, o que seria vital para a sua sobrevivência na superfície da planta hospedeira (MIMS et al., 1995). Tais observações demonstram que os conídios produzidos em cultura são viáveis por períodos de tempo menores que aqueles que permanecem no tecido hospedeiro (MIMS et al., 1995).

Entre as características observadas durante o envelhecimento dos conídios estão a diminuição dos corpos lipídicos (figs. 27 e 29) e a vacuolização (figs. 27 e 28), condições já observados previamente em estudos com *C. graminicola* e *C. gloeosporioides* (MIMS et al., 1995; SCHADECK; BUCHI; LEITE, 1998b). Neste contexto, o envelhecimento das culturas aconteceu simultaneamente com a limitação de nutrientes, condição em que a diminuição de corpos lipídicos seria esperada para a manutenção do metabolismo celular. Além disso, a evidência de

atividade autofágica nos conídios velhos (fig. 29) indica que estes conídios estavam começando a sofrer estresse nutricional (MIMS et al., 1995). Segundo MIMS e colaboradores (1995), a depleção das reservas primárias provavelmente está relacionada à diminuição da viabilidade dos conídios velhos. Conídios de *C. graminicola* de culturas velhas (de aproximadamente 35 dias), por exemplo, já começam a mostrar capacidade de germinação diminuída (LEITE; NICHOLSON, 1992).

A internalização dos corpos lipídicos pelos vacúolos de conídios não germinados (fig. 30) e de apressórios (fig. 13) observada em *C. acutatum* já foi verificada em outros fungos. Em *M. grisea* esse processo foi demonstrado em vacúolos de apressórios (WEBER et al., 2001). As invaginações encontradas na membrana vacuolar de *C. acutatum* sugerem a ocorrência de processo microautofágico, como demonstrado em conídios não germinados de *C. graminicola* (SCHADECK; LEITE; BUCHI, 1998a). Assim, a internalização e posterior digestão dos corpos lipídicos pelos vacúolos parece ser uma característica comum do metabolismo celular fúngico.

A vacuolização observada aqui (fig. 28) tem sido demonstrada durante o envelhecimento (MIMS et al., 1995). A retenção de laranja de acridina pelos vacúolos confirmou que eles são organelas acídicas, e que apresentam tamanho e morfologia heterogêneas. As vesículas intravacuolares mais intensamente marcadas que o lúmen vacuolar (verificadas através de marcação com laranja de acridina), já foram descritas em conídios de *C. graminicola* marcados com vermelho neutro (SCHADECK et al., 2003) e em apressórios de *M. grisea* (WEBER et al., 2001).

O acúmulo de corpos intravacuolares nos conídios não germinados após o tratamento com PMSF (fig. 30 e filme 5) indica que as estruturas dentro do vacúolo estavam destinadas à digestão, sugerindo processo autofágico (LEVINE; KLIONSKY, 2004). Tal observação está de acordo com o conceito de que a autofagia é um mecanismo que protege os organismos unicelulares contra a deficiência de nutrientes ou outras formas de estresse ambiental (LEVINE; KLIONSKY, 2004). Estudos têm mostrado que a autofagia parece sofrer aumento durante a privação de nutrientes (BERGAMINI et al., 2004), condição observada durante o envelhecimento das culturas de *C. acutatum*, e é essencial em vários processos celulares, como a remodelação celular e a diferenciação (LEVINE;

KLIONSKY, 2004). A quebra dos corpos autofágicos e seu conteúdo depende entre outros fatores de proteinase B (TAKESHIGE et al., 1992). Na presença de PMSF, a quebra das proteínas dos corpos autofágicos poderia estar sendo inibida (TETER; KLIONSKY, 2000), resultando nos grânulos intravacuolares observados aqui. O acúmulo de corpos autofágicos dentro dos vacúolos de leveduras tratadas com PMSF já foi descrito por LEVINE e KLIONSKY (2004).

O conteúdo lipídico dos conídios também diminuiu nos conídios durante a germinação sobre membrana de celofane (figs. 4 e 5), à semelhança da diminuição observada previamente sobre superfícies de vidro (CARMO et al., 2003a). Esta diminuição foi mais rápida durante a germinação do que durante o envelhecimento, ou seja, a diminuição de lipídeos que levava de 10 a 20 dias na senescência do conídio, aconteceu dentro do período de 24-48 horas durante a germinação. Tal fato era esperado uma vez que os conídios, como outros esporos, exibem baixo metabolismo se comparado ao alto metabolismo do estado da germinação (GRIFFIN, 1994). O rápido consumo dos corpos lipídicos durante a germinação demonstra a sua importância como reserva de energia (MURPHY, 2001), especialmente considerando a ausência de nutrientes exógenos na germinação. O conjunto de resultados demonstra a importância dos corpos lipídicos, independente da fase de desenvolvimento de *C. acutatum*.

A compreensão dos mecanismos celulares de *C. acutatum*, como a mobilização de reservas endógenas, tem importantes implicações práticas, podendo auxiliar na elaboração de estratégias de controle da antracnose, doença que causa grande prejuízo para a agricultura. Além disso, os resultados obtidos neste trabalho abrem novas perspectivas de investigação em aspectos cruciais da patogênese em fungos, em especial dos processos envolvidos na melanização e penetração do hospedeiro pelo fungo.

7. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos conclui-se que em *C. acutatum*:

1. Apressórios observados através de MET apresentam uma camada bastante espessa e eletrodensa, possivelmente correspondente à camada de melanina observada através de DIC e microscopia de luz;
2. Ocorre penetração em membranas de celofane a partir de apressórios não melanizados, com a formação de hifas primárias dentro do celofane, assim como o que ocorre nos apressórios melanizados;
3. A carpropamida e a sacarose promovem o acúmulo de corpos lipídicos no citoplasma dos conídios germinados;
4. As três maiores concentrações de carpropamida utilizadas promoveram um aumento na porcentagem de conídios secundários;
5. Não há alteração aparente na secreção de matriz extracelular na presença de carpropamida, e em MEV e DIC, observa-se que essa secreção é crescente nos apressórios à medida que estes amadurecem;
6. É verificada a presença de grânulos eletrodensos intracelulares e na parede celular de apressórios do controle e tratamento com carpropamida, o que pode ser evidência de processo secretório;
7. O desenvolvimento de conídios acontece a partir dos lados ou extremidades de uma hifa, no último caso, com a formação de células conidiogênicas especializadas, as fiálides, formadas de ramificações das hifas;
8. A formação de conídios secundários ocorre em diferentes padrões, concomitante ou não com a formação das estruturas de germinação e infecção;
9. O acúmulo de corpos lipídicos e a reorganização de pequenos vacúolos nos conídios secundários acontecem juntamente com a vacuolização e diminuição de lipídeos no conídio germinado;
10. Durante o envelhecimento dos conídios em cultura ocorre a diminuição de corpos lipídicos e a formação de grandes vacúolos;
11. Autofagia de corpos lipídicos e de outras estruturas membranosas acontece em vacúolos de conídios não germinados, germinados e de apressórios;
12. A ocorrência de autofagia pôde ser constatada com o uso de inibidor de protease vacuolar.

8. REFERÊNCIAS

- ADASKAVEG, J. E.; HARTIN, R. J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. **Phytopathology**, v. 87, p. 979-987, 1997.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4ª ed., Artes Médicas. Porto Alegre, 2004.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4ª ed., 1996.
- ALVIANO, D. S.; FRANZEN, A. J.; TRAVASSOS, L. R.; HOLANDINO, C.; ROZENTAL, S.; EJZEMBERG, R.; ALVIANO, C. S.; RODRIGUES, M. L. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* Induces Production of Human Antifungal Antibodies and Enhances the Antimicrobial Efficacy of Phagocytes. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 1, p. 229-237, 2004.
- ANDERSON, R. G.; ORCI, L. A view of acidic intracellular compartments. **J. Cell Biol.**, v. 106, p. 539-543, 1998.
- ANDERSON, J. G.; SMITH, J. E. The production of conidiophores and conidia by newly germinated conidia of *Aspergillus niger* (microcycle conidiation). **J. Gen. Microbiol.**, v. 69, p. 185-197, 1971.
- ARAUZ, L. F. Mango anthracnose: Economic impact and current options from integrated management. **Plant Dis.**, v. 84, p. 600-611, 2000.
- ATKINSON, H-A.; DANIELS, A.; READ, N. D. Live-cell imaging of endocytosis during conidial germination in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*, **Fungal Genet. Biol.**, v. 37, p. 233-244, 2002.
- BAILEY, J. A.; JEDER, M. J. (eds). 1992. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. **CAB International**. Wallingford UK.
- BAILEY, J. A.; NASH, C.; MORGAN, L. W.; O'CONNELL, R. J. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY JA, Jeder MJ (eds), **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**, p. 88-120. CAB International. Wallingford UK, 1992.

BARBOSA, A. C. Caracterização do sistema vacuolar durante a germinação de conídios de *Colletotrichum acutatum*. In: **Evento de iniciação científica**, 12, Curitiba: UFPR, p. 22, 2004.

BARBOSA, A. C. **Efeitos da carpropamida e sacarose sobre a melanização e mobilização de lipídeos em *Colletotrichum acutatum***. Curitiba, 2005. Monografia - Universidade Federal do Paraná.

BARBOSA, A. C.; SCHADECK, R. J. G.; DO CARMO, A. E.; GRAF, L.; TOMÁZ, R.; DE SOUZA, C. F.; MENDES, J.; RANDI, M. A. F.; BUCHI, D. Morphology and lipid body and vacuole dynamics during secondary conidia formation in *Colletotrichum acutatum*: laser scanning confocal analysis. **Can. J. Microbiol.**, v. 52, n. 2, 2006.

BELL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 24, p. 411-451, 1986.

BERGAMINI, E.; CAVALLINI, G.; DONATI, A.; GORI, Z. The role of macroautophagy in the ageing process, anti-ageing intervention and age-associated diseases. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, p. 2392-2404, 2004.

BOJOVIC-CVETIC, D.; VUJICIC, R. Acid phosphatase and distribution in *Aspergillus flavus*. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, v. 79, p. 137-141, 1982.

BONNEN, A. M.; HAMMERSCHMIDT, R. Role of cutinolytic enzymes in infection of cucumber by *Colletotrichum lagenarium*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 35, p. 475-481, 1989.

BOURETT, T. M.; HOWARD, R. J. In vitro development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Can. J. Bot.**, v. 68, 329-342, 1990.

BRAUN, E. J.; HOWARD, R. J. Adhesion of fungal spores and germlings to host plant surfaces. **Protoplasma** 181, p. 202-212, 1994

BUTLER, M. J.; GARDINER, R. B; DAY, A. W. Degradation of melanin or inhibition of its synthesis: are these a significant approach as a biological control of phytopathogenic fungi? **Biol. Control**, 32, p. 326-336, 2005.

CARMO, A. E. do; SOUZA, C. F.; MENDES, J.; RANDI, M. A. F.; BUCHI, D. F.; SCHADECK, R. J. G. Lipid bodies mobilization during germination of *Colletotrichum acutatum* conidia monitored through confocal analysis. **Acta microscópica**, v. 12, p. 177-178, 2003a.

CARMO, A. E. do; SOUZA, C. F.; MENDES, J.; RANDI, M. A. F.; BUCHI, D. F.; SCHADECK, R. J. G. Vacuoles during germination of *Colletotrichum acutatum* conidia monitored through confocal analysis. **Acta microscópica**, v. 12, p. 277, 2003b.

CARVER, T. L. W.; THOMAS, B. J.; INGERSON-MORRIS, S. M. The surface of *Erysiphe graminis* and the production of extracellular material at the fungus-host interface during germling and colony development. **Can. J. Bot.**, v. 73, 1995.

CARZANIGA, R.; BOWYER, P.; O'CONNELL, R. Production of extracellular matrices during development of infection structures by the downy mildew *Peronospora parasitica*. **New Phytol.**, 149, p. 83-93, 2001.

CHIDA, T.; SISLER H. D. Restoration of appressorial penetration ability by melanin precursors in *Pyricularia oryzae* treated with antipenetrants and in melanin deficient mutants. **J. Pestic. Sci.**, v. 12, p. 49-55, 1987.

CHUMLEY, F. G.; VALENT, B. Genetic analysis of melanin-deficient, non-pathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 3, p. 135-143, 1990.

COLE, L.; ORLOVICH, D. A.; ASHFORD, A. E. Structure, Function, and Motility of Vacuoles in Filamentous. **Fungal Genet. Biol.**, v. 24, p. 86-100, 1998.

DARA S.; SEMTNER, P. J. Influence of substrate type and temperature on the developmental morphology of *Pandora neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales), a pathogen of the tobacco aphid (Homoptera: Aphididae). **Journal Invertebr. Pathol.**, v. 72, p. 222-228, 1998.

DAVIES, K. A.; DE LORONO, I.; FOSTER, S. J.; LI, D.; JOHNSTONE, K.; ASHBY, A. M. Evidence for a role of cutinase in pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on brassicas. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 57, p. 63-75, 2000.

DEISING, H. B.; WERNER, S; WERNITZ, M. The role of fungal appressoria in plant infection. **Microbes Infect.**, v. 2, n. 13, p. 1631-1641, 2000.

DIÉGUEZ-URIBEONDO, J.; FÖRSTER, H.; ADASKAVEG, J. E. Digital Image Analysis of Internal Light Spots of Appressoria of *Colletotrichum acutatum*. **Biochem. Cell Biol.**, v. 93, n. 8, p. 923- 930, 2003.

DOSS, R. P.; DEISENHOFER, J.; NIDDA, H. A. K.; SOELDNER, A. H.; MCGUIRE, R. P. Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 687-691, 2003.

DURAN, N.; ESPÓSITO, E. Potencial applications of oxidative enzyme and phenoxidase-like compounds in wastewater and soil treatment a review. **Appl. Catal. B: Environ.**, v. 28, n. 2, p. 83-99, 2000.

EMMETT, R. W.; PARBERY, D. G. Appressoria. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 13, p. 147-167, 1975.

GOLD, S. E.; GARCÍA-PEDRAJAS, M. D.; MARTÍNEZ-ESPINOZA, A. D. New (and used) approaches to the study of fungal pathogenicity. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 39, p. 337-365, 2001.

FERREIRA-LEITÃO, V. S.; SILVA, J. G. da; BON, E. P. S. Methylene blue and azure B oxidation by horseradish peroxidase: a comparative evaluation of class II and class III peroxidases. **Appl. Catal. B: Environ.**, v. 42, p. 213-221, 2003.

FRANZEN, A. J.; SOUZA, W.; FARINA, M.; ALVIANO, C. S.; ROZENTAL, S. Morphometric and densitometric study of the biogenesis of electron-dense granules in *Fonsecaea pedrosoi*. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 173, p. 395-402, 1999.

FREDERICK, B. A.; CAESAR-TONTHAT, T. C.; WHEELER M.; SHEEHAN, K. B.; EDENS, W. A.; HENSON, J. M. Isolation and characterization of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* melanin mutants. **Mycol. Res.**, n. 103, p. 99-110, 1999.

FREEMAN, S. Genetic diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruits. In: Prusky, D., FREEMAN, S., DICKMAN, M. B. (eds), **Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction**, p. 131-144. The American Phytopathological Society. St. Paul MN, 2000.

GEIS, P. A.; WHEELER, M. H.; SZANISZLO, P. J. Pentaketide metabolites of melanin synthesis in the dematiaceous fungus *Wangiella dermatitidis*. **Arch. Microbiol.**, v. 137, p. 324-328, 1984.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. Second edition, John Wiley & Sons, Inc., 1994.

HALL, R. Pathogenicity of *Monilinia fructicola*. Part III: Penetration of peach leaf and fruit. **Phytopathologische Zeitschrift** 72, p. 281-290, 1971.

HÄNSSLER, G. D. P.; MAXWELL M. D., Demonstration of acid phosphatase-containing vacuoles in hyphal tip cells of *Sclerotium rolfsii*. **J. Bacteriol.**, v. 124, p. 997-1006, 1975.

HENSON, J. M.; BUTLER, M. J.; DAY, A. W. The Dark Side of the Mycelium: Melanins of Phytopathogenic Fungi. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 37, p. 447-471, 1999.

HERBERT, C.; O'CONNELL, R.; GAULIN, E.; SALESSES, V.; TUGAYE, M-T-E; DUMAS, B. Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. **Fungal Genet. Biol.**, v. 41, n. 2, p. 140-147, 2004.

HOWARD, R. J.; FERRARI, M. Role of melanin in appressorium formation. **Exp. Mycol.**, v. 13, p. 403-418, 1989.

HOWARD, R. J.; FERRARI, M. A.; ROACH, D. H.; MONEY, N. P. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 11281-11284, 1991.

HOWARD, C. M.; MAAS, J. L.; CHANDLER, C. K.; ALBREGTS, E. E. Anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum* complex in Florida. **Plant Dis.**, v. 76, p. 796-981, 1992.

HOWARD, R. J.; VALENT, B. Breaking and entering: Host Penetration by the Fungal Rice Blast Pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 50, p. 491-512, 1996.

JACOBSON, E. S. Pathogenic Roles for Fungal Melanins. **Clin. Microbiol. Rev.**, p. 708-717, 2000.

JENNINGS, L. D.; RAYNER, D. R.; JORDAN, D. B.; OKONYA, J. F.; BASARAB, G. S.; AMOROSE, D. K.; ANACLERIO, B. M.; LEE, J. K.; SCHWARTZ, R. S.; WHITMORE, K. A. Cyclobutane Carboxamide Inhibitors of Fungal Melanin: Biosynthesis and their Evaluation as Fungicides. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 8, p. 897-907, 2000.

KAWAMURA, C.; MORIWAKI, J.; KIMURA, N.; FUJITA, Y.; FUJI, S.; HIRANO, T.; KOIZUMI, S.; TSUGE, T. The Melanin Biosynthesis Genes of *Alternaria alternata* Can Restore Pathogenicity of the Melanin-Deficient Mutants of *Magnaporthe grisea*. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 10, n. 4, p. 446-453, 1997.

KAWAMURA, C.; TSUJIMOTO, T.; TSUGE, T. Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternate*. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 12, p. 59-63, 1999.

KERRIGAN, J.; MIMS, C. W. Ultrastructural cytochemical investigations of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, causal organism of pecan anthracnose. **The BEAM Newsletter of the Southeastern Electron Microscopy Society**, v. 9, p. 21-25, 1993.

KIM, J. C.; MIN, J. Y.; KIM, H. T.; KIM, B. S.; KIM, Y. S.; KIM, B. T.; YU, S. H.; YAMAGUCHI, I.; CHO, K. Y. Target site of a new antifungal compound KC10017 in the melanin Biosynthesis of *Magnaporthe grisea*. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 62, p. 102-112, 1998.

KLIONSKY, D. J.; HERMAN, P.K.; EMR, S. D. The fungal vacuole: composition, function and biogenesis. **Microbiol. Rev.**, v. 54, p. 266-292, 1990.

KÖLLER, W. The plant cuticle, a barrier to be overcome by fungal plant pathogens. In: Cole, G. T.; Hoch, H. C. (eds). **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. Plenum Press: New York, p. 219-246, 1991.

KUBO, Y.; FURUSAWA, I. Prerequisite for successful invasion of the plant host by appressoria of *Colletotrichum* and *Pyricularia*. **The Fungal Spore Disease Initiation in Plants and Animals**, Ed: Cole, G. T. and Hoch, H. Plenum Press, New York and London, p. 205-218, 1991.

KUBO, Y.; SUZUKI, K.; FURUSAWA, I.; YAMAMOTO, M. Scytalone as a natural intermediate of melanin biosynthesis in appressoria of *Colletotrichum lagenarium*, **Exp. Mycol.**, v. 7, 208, 1983.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 57, p. 47-125, 1997.

KUNS, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G. de; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

KURAHASHI, Y. Enhancement of phytoalexin synthesis during rice blast infection of leaves by pre-treatment with carpropamid. **J. Pestic. Sci.**, v. 24, n. 4, p. 369-374, 1999.

KURAHASHI, Y. Melanin Biosynthesis Inhibitors (MBIs) for Control of Rice Blast. **Pesticide Outlook**, p. 32-35, 2001.

KURAHASHI, Y.; HÄNßLER, G. WIN® (carpropamid) - an ideal fungicide for nursery-box treatment. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, v. 3, n. 51, p. 207-218, 1998.

KURAHASHI, Y.; SAKAWA, S.; KINBARA, T.; TANAKA, K.; KAGABU, S. Biological activity of carpropamid (KTU3616): A new fungicide for rice blast disease. **J. Pestic. Sci.**, v. 22, n. 108, 1997.

LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGEA, A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genet. Biol.**, v. 38, p. 143-158, 2003.

LEANDRO, L-F-S; GLEASON, M. L.; NUTTER, F. W.; WEGULO, S. N.; DIXON P. M. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. **Phytopathology**, v. 92, p. 659-664, 2001.

LEITE, B.; NICHOLSON, R. L. Mycosporine-alanine, a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Exp. Mycol.**, v. 16, p. 76-86, 1992.

LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J. Development by Self-Digestion Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. **Dev. Cell**, v. 6, n. 4, p. 463-477, 2004.

LOPES, L. **Efeitos do medicamento homeopático canova no sistema endossomal/lisossomal e corpos lipídicos de macrófagos**. Curitiba, 2004. Dissertação - Universidade Federal do Paraná.

LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, n. 9, p. 409-414, 1961.

MARKS, M. S.; SEABRA, M. C. The melanosome: membrane dynamics in black and white. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 2, p. 1-11, 2001.

MARTÍN, M. P.; GARCÍA-FIGUERES, F. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* caused anthracnose on olives. **Eur. J. Plant Pathology**, v. 105, p. 733-745, 1999.

MENDGEN, K.; DEISING, H. Infection structures on fungal plant pathogens - a cytological and physiological evaluation. Tansley Review n. 48, **New Phytol.**, v. 124, p. 193-213, 1993.

MENDGEN, K.; HAHN, M.; DEISING, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 34, p. 367-386, 1996.

MERCURE, E. W.; KUNOH, H.; NICHOLSON, R. L. Visualization of materials released from adhered, ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 46, p. 121-135, 1995.

MIMS, C. W. Using electron microscopy to study plant pathogenic fungi. **Mycologia**, v. 83, p. 1-19. 1991.

MIMS, C. W.; RICHARDSON, E. A.; CLAY, R. P.; NICHOLSON, R. L. Ultrastructure of conidia and the conidium aging process in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*. **Int. J. Plant. Sci.**, v. 156, p. 9-18, 1995.

MIZUSHIMA, N. Methods for monitoring autophagy. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, n. 12, p. 2491-2502, 2004.

MONEY, N. P.; HOWARD, R. J. Confirmation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure, and pathogenicity using a new method of turgor measurement. **Fungal Genet. Biol.**, v. 20, p. 217-227, 1996.

MORIYASU, Y.; OSHUMI, Y. Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation. **Plant Physiol.**, v. 111, p. 1233-124, 1996.

MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progr. Lipid Res.**, v. 40, p. 325-438, 2001.

NICHOLSON, R. L.; EPSTEIN, L. Adhesion of fungi to plant surface: Prerequisite for pathogenesis. **The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals**, p. 3-23, 1991.

NICHOLSON, R. L.; HIPSKIND, J.; HANAU, R. M. Protection against phenol toxicity by the spore mucilage of *Colletotrichum graminicola*, an aid to secondary spread. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 35, p. 243-252, 1989.

NODA, T.; OSHUMI, Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in Yeast. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 3963-3966, 1998.

OLD, K. M.; ROBERTSON, W. M. Effects of lytic enzymes and natural soil on the fine structure of conidia of *Cochliobolus sativus*. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 54, p. 343-350, 2005.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiol. Plant Pathol.**, v. 27, p. 75-98, 1985.

OSHEROV, N.; MAY, G. S. The molecular mechanisms of conidial germination. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 199, n. 2, p. 153-160, 2001.

PASCHOLATI, S. F.; DEISING, H.; LEITE, B.; ANDERSON, D.; NICHOLSON, R. L. Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 42, p. 37-51, 1993.

PASCHOLATI, S. F.; YOSHIOKA, H.; KUNOH, H.; NICHOLSON, R. L. Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*: Cutinase is a component of the conidial exudates. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, London, v. 41, p. 53-59, 1992.

PERFECT, S.; HUGHES, H. B.; O'CONNELL, R. J.; GREEN, J. R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genet. Biol.**, v. 27, p. 186-198, 1999.

PINHO, C. A.; LOURDES, M.; POLIZELI, T. M.; JORGE, J. A. TEREZI, E. Mobilization of trehalose in mutants of cyclic APM signalling pathway, cr-1 (CRISP-1) and mcb (microcycle conidiation) of *Neurospora crassa*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 199, p. 85-89, 2001.

POLAK, A. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. **Mycoses**, v. 33, n. 5, p. 215-224, 1989.

POLITIS, D. J. Ultrastructure of penetration by *Colletotrichum graminicola* of highly resistant oat leaves. **Physiol. Plant Pathol.**, v. 8, p. 117-122, 1976.

POLITIS, D. J.; WHEELER, H. Ultrastructural study of penetration of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. **Physiol. Plant Pathol.**, v. 3, p. 465-471, 1973.

PONS, M. N.; DROUIN, J. F.; LOUVEL, L.; VANHOUTTE, B.; VIVIER, H.; GERMAIN, P. Physiological investigations by image analysis. **J. Biotechnol.**, v. 65, p. 3-14, 1998.

PRYCE-JONES, E.; CARVER, T.; GURR, S. J. The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 55, p. 175-182, 1999.

REHNSTROM, A. L.; FREE, S. J. The isolation and characterization of melanin-deficient mutants of *Monilinia fructicola*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 49, p. 321-330, 1996.

REGGIORI, F.; KLIONSKY, D. J. Autophagosomes: biogenesis from scratch? **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 17, p. 415-422, 2005.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron – opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, New York, n. 17, p. 208-212, 1963.

RILEY, P. A. Melanin. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 29, n. 29, p. 1235-1239, 1997.

RUCH, D. G.; MOTTA, J. J. Ultrastructure and cytochemistry of dormant basidiospores of *Psilocybe cubensis*. **Mycologia**, v. 79, p. 387-398, 1987.

STAHL, D. J.; SCHÄFER, W. Cutinase is not required for fungal pathogenicity on pea. **Plant Cell**, n. 4, p. 621-629, 1992.

SCHADECK, R. J. G.; BUCHI, D. F.; LEITE, B. Ultrastructural aspects of *Colletotrichum graminicola* conidium germination, appressorium formation and penetration on cellophane membranes: focus on lipid reserves. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 30, p. 555-561, 1998b.

SCHADECK, R. J. G.; LEITE, B.; BUCHI, D. F. Lipid mobilization and acid phosphatase activity in lytic compartments during conidium dormancy and appressorium formation. **Cell. Struct. Funct.**, v. 23, p. 333-340, 1998a.

SCHADECK, R. J. G.; RANDI, M. A. F.; BUCHI, D. F.; LEITE, B. Vacuolar system of ungerminated *Colletotrichum graminicola* conidia: convergence of autophagic and endocytic pathways. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 218, p. 277-283, 2003.

SAITO, M. Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. **New Phytol.**, v. 129, p. 425-431, 1995.

SAKAI, Y.; KOLLER, A.; RANGELL, L. K.; KELLER, G.; SUBRAMANI, S. Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: identification of specific steps and morphological intermediates. **J. Cell Biol.**, v. 141, p. 625-636, 1998.

SELA-BUURLAGE, M.B.; EPSTEIN, L.; RODRIGUEZ, R. J. Adhesion of ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 39, p. 345-352, 1991.

SILVA, M. B.; CUNHA, M. M.; ZANARDI, E.; FRANZEN, A. J.; RODRIGUES, M. L.; SALGADO, C. G.; ROZENTAL, S. Immunocytochemistry of melanosomes in the fungus *Fonsecaea pedrosoi*. In: **XX Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise**, 2005, Águas de Lindóia, p. 212.

SLADE, S. J., HARRIS, R. F., SMITH, C. S., ANDREWS, J. H. Microcyclic conidiation and spore-carrying capacity of *Colletotrichum gloeosporoides* on solid media. **Appl. Environ. Microbiol.**, n. 53, p. 2106-2110, 1987.

SMITH, J. E.; ANDERSON, J. G.; DEANS, S. G.; BERRY, D. R. Biochemistry of microcycle conidiation. In: **Biology of Conidial Fungi**, v. 2, p. 329-356, G. T. Cole e B. Kendrick, eds. Academic Press, New York, 1981.

SUGUI, J. A. **Estudo das matrizes extracelulares secretadas pelos fungos *Cochliobolus heterostrophus*, *Colletotrichum graminicola* e *Pestalotia malicola***. Curitiba, 1998. Tese - Universidade Federal do Paraná.

SUZUKI, K.; FURUSAWA, I.; ISHIDA, N.; YAMAMOTO, M. Chemical dissolution of cellulose membranes as a prerequisite for penetration from appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 128, p. 1035-1039, 1982.

TAKANO, Y.; KUBO, Y.; KAWAMURA, C.; TSUGE, T.; FURUSAWA, I. The *Alternaria alternata* melanin biosynthesis gene restores appressorial melanization and penetration of cellulose membranes in the melanin-deficient albino mutant of *Colletotrichum lagenarium*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 21, p. 131-140, 1997.

TAKESHIGE, K.; BABA, M.; TSUBOI, S.; NODA, T.; OHSUMI, Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. **J. Cell Biol.**, v. 119, p. 301-311, 1992.

TETER, S. A.; KLIONSKY, D. J. Transport of proteins to the yeast vacuole: autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting, and role of the vacuole in degradation. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 11, p. 173-179, 2000.

THINES, E.; WEBER, R. W. S.; TALBOT, N. J. MAP kinase and protein kinase A – Dependent mobilization during of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnapothe grisea*. **Plant Cell**, v. 12, p. 1703-1718, 2000.

THOMPSON, A. R.; VIERSTRA, R. D. Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.**, In Press, Corrected Proof, 2005.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *hanerochaete chrysosporium*. **Science**, 221, p. 661–663, 1983.

TSUJI, G.; TAKEDA, T.; FURUSAWA, I.; HORINO, O.; KUBO, Y. Carpropamida, an anti-rice blast fungicide, inhibits scytalone dehydratase activity and appressorial

penetration in *Colletotrichum lagenarium*. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 57, p. 211-219, 1997.

TSUKADA, M.; OHSUMI, Y. isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 333, p. 169-174, 1999.

VAN DYKE, C. G.; MIMS C. W. Ultrastructure of conidia, conidium germination, and appressorium development in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum truncatum*. **Can. J. Bot.**, v. 69, p. 2455-2467, 1991.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; KOCSUBÉ, S.; FARKAS, B.; PÁL, K. Diversity of polyketide synthase gene sequences in *Aspergillus* species. **Res. Microbiol.**, v. 154, n. 8, p. 593-600, 2003.

WALTON, J. D. Deconstructing the cell wall. **Plant Physiol.**, v. 104, p. 1113-1118, 1994.

WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v. 4, p. 475-478, 1958.

WEBER, R-W.; WAKLEY, G. E.; THINES, E.; TALBOT, N. J. The vacuole as central element of the lytic system and sink for lipid droplets in maturing appressoria of *Magnaporthe grisea*. **Protoplasma**, v. 226, p. 202-222, 2001.

WEETE, J. D. Spore lipid surface wax composition; metabolism during germination In: **Infection process of fungi**. 1984.

WHARTON, P. S.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. The biology of *Colletotrichum acutatum*. **An. Jard. Bot. Madr.**, v. 61, n. 1, p. 3-22, 2004.

WHEELER, M. H.; BELL, A. A. Melanins and their importance in pathogenic fungi. **Curr. Top. Med. Mycol.**, v. 2, p. 338-387, 1988.

WHEELER, M. H.; STIPANOVIC, R. D. Melanin biosynthesis and the metabolism of flavolin and 2-hydroxyjuglone in *Wangiella dermatitidis*. **Arch. Microbiol.**, n. 142, p. 234-241, 1985.

WOLOSHUK, C. P; SISLER, H. D. Tricyclazole, pyroquilon, tetrachlorophthalide, PCBA, coumarin and related compounds inhibit melanization and epidermal penetration by *Pyricularia oryzae*. **J. Pestic. Sci.**, v. 7, 161, 1982.

WONG, Y.; YU, J. Laccase catalyzed decolorization of synthetic dyes. **Wat. Res.**, v. 33, n. 16, p. 3512-3520, 1999.

XIAO, J.; OHSHIMA, A.; KAMAKURA, T.; ISHIYAMA, T.; YAHAMAGUCHI, I. Extracellular glycoprotein(s) associated with cellular differentiation in *Magnapotha grisea*. **Mol. Plant Microbe Interaction**, v. 7, p. 639-644, 1994.

ZULFIQAR, M.; BRLANSKY, R. H.; TIMMER, L. W. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **Mycologia** 88, p. 121-128, 1996.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - LEGENDA DOS FILMES

APÊNDICE 2 - GRÁFICOS DO PADRÃO DE GERMINAÇÃO E PENETRAÇÃO NA
PRESENÇA DO INIBIDOR DE MELANIZAÇÃO

APÊNDICE 1 - LEGENDA DOS FILMES

(Os filmes encontram-se em CD anexo)

FILME 1: Coloração com vermelho Nilo de Conídio não germinado incubado com carpropamida por 24 horas. Grandes corpos lipídicos são observados no citoplasma.

FILME 2: Conídio germinado corado com vermelho Nilo mostrando os corpos lipídicos em diferentes fatias ópticas.

FILME 3: Conídio germinado corado com vermelho Nilo. O conídio é girado para observação dos corpos lipídicos no conídio germinado e conídio secundário.

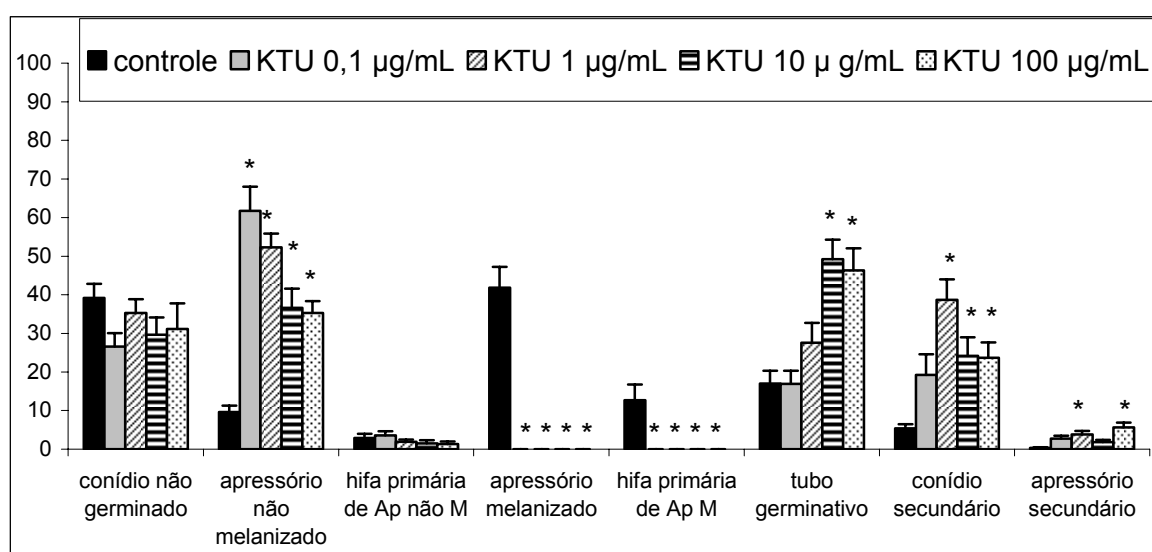
FILME 4: Conídio não germinado do controle praticamente sem granulações intravacuolares observado através de DIC.

FILME 5: Conídio não germinado tratado com PMSF mostrando o acúmulo e movimentação de granulações dentro dos vacúolos sem qualquer marcação, observado através de DIC.

APÊNDICE 2 - GRÁFICOS DO PADRÃO DE GERMINAÇÃO E PENETRAÇÃO NA PRESENÇA DO INIBIDOR DE MELANIZAÇÃO

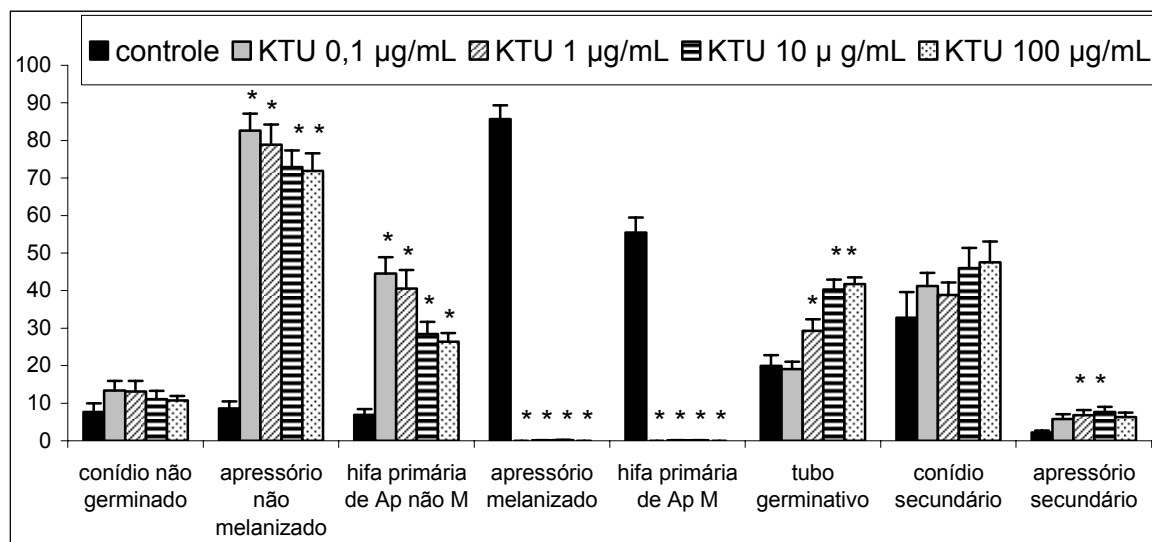
Os dados obtidos nas tabelas 1 e 2 (ver item 5.1.5.5), quando desmembrados em seus padrões individuais e plotados em gráficos facilitaram a análise da evolução da germinação nas condições testadas, como segue.

GRÁFICO 1 - PADRÃO DE GERMINAÇÃO E PENETRAÇÃO EM 24 HORAS DE INCUBAÇÃO COM INIBIDOR DE MELANIZAÇÃO



NOTA: No eixo "x" estão representados os padrões de germinação nas diferentes concentrações de tratamento com carpropamida (µg/mL). Os valores do eixo "y" indicam a média ± erro padrão da média e foram comparados através do teste ANOVA. Valores significativamente diferentes do controle (*) foram definidos usando o pós-teste de Dunnett; $\alpha=0,05$. Apressório (Ap); melanizado (M).

GRÁFICO 2 - PADRÃO DE GERMINAÇÃO E PENETRAÇÃO EM 48 HORAS DE INCUBAÇÃO COM INIBIDOR DE MELANIZAÇÃO



NOTA: No eixo "x" estão representados os padrões de germinação nas diferentes concentrações de tratamento com carpropamida (µg/mL). Os valores do eixo "y" indicam a média ± erro padrão da média e foram comparados através do teste ANOVA. Valores significativamente diferentes do controle (*) foram definidos usando o pós-teste de Dunnett; $\alpha=0,05$. Apressório (Ap); melanizado (M).